



**Ana Isabel da Graça
Barranqueiro Caço**

**Influência do Par Iónico na Partição de
Fluoroquinolonas**



**Ana Isabel da Graça
Barranqueiro Caço**

**Influência do Par Iónico na Partição de
Fluoroquinolonas**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Dra. Isabel Maria Delgado Jana Marrucho Ferreira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Lúcia Maria da Silva Rebelo Gomes

Professora coordenadora da Universidade Fernando Pessoa

Prof^a. Doutora Maria Alice Zarur Coelho

Professora associada nível 1 da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Doutora Isabel Maria Delgado Jana Marrucho Ferreira

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero aqui deixar algumas palavras de agradecimento a todos aqueles que de alguma maneira foram imprescindíveis na realização deste trabalho.

Começo por agradecer à minha orientadora Doutora Isabel Marrucho pela confiança que sempre demonstrou na minha capacidade para realizar este trabalho, assim como todo o seu empenho na orientação do mesmo. Quero agradecer ao Doutor João Coutinho pelo incentivo que me deu e apoio durante a realização deste trabalho.

A todos os elementos do grupo Path, quero aqui deixar o meu muito obrigada, todos os dias aprendo algo de novo com vocês, até mesmo como desorganizar um laboratório em três tempos. Muito obrigada pela vossa ajuda e apoio ao longo destes meses. Quero no entanto salientar algumas pessoas: A Liliana por toda a sua ajuda na fase inicial, foi o pontapé de saída deste trabalho e tornou-se na minha amiga-quase-prima. À Ana Dias agradeço todo o incentivo demonstrado desde o primeiro minuto (quando eu ainda tinha mil dúvidas para resolver...) e todo o apoio que me deu para que este trabalho chegasse a bom porto. Por fim a Carla... para lhe agradecer faltam-me as palavras certas, mas como eu sei que ela gosta das coisas bem simples aqui fica o meu sincero Muito Obrigada! Obrigada por toda a ajuda, por todo o apoio e encorajamento quando as coisas corriam menos bem. Obrigada pelas explicações de química orgânica e analítica... o que seria de mim sem elas... enfim obrigada por teres estado sempre presente neste período da minha vida.

Não posso esquecer as meninas do 1º andar, a Joana Mendes e a Sónia Prozil, também conhecidas como siamesas, que em muitas alturas alegraram os meus dias com a sua espontaneidade e simpatia. Ao Rui Duarte e à Vânia obrigada pela vossa companhia e palavras de apoio sempre presentes.

Quero ainda agradecer todo o apoio que recebi da minha família. Aos meus pais por terem sempre uma palavra de consolo e encorajamento para que me sinta sempre confiante. Ao Tô-Zé e principalmente à Helena pela paciência que tiveram quando o meu humor não era o melhor e a disponibilidade era pouca. Um obrigada muito especial à Helena pelo seu empenho na escolha das cores dos meus gráficos.

palavras-chave

fluoroquinolona, lipofilicidade, coeficiente de partição, par iónico, contra iões.

resumo

As fluoroquinolonas são uma classe importante de agentes antimicrobianos sintéticos com elevado potencial terapêutico. Estes fármacos apresentam um vasto espectro de actividade que abrange microorganismos gram-negativos, gram-positivos, aeróbios e anaeróbios. As suas propriedades farmacocinéticas permitem boa distribuição ao nível dos tecidos e plasma, estabilidade química e biológica e baixa incidência de efeitos secundários. A actividade antibacteriana destes compostos é fortemente dependente do pH e da sua lipofilicidade. Assim, para melhor se compreender a estrutura/actividade destes compostos é importante conhecer as propriedades ácido-base, o respectivo equilíbrio de protonação e a sua lipofilicidade.

Com este trabalho pretende-se estudar a influência da formação de pares iónicos na lipofilicidade de duas fluoroquinolonas, a moxifloxacina e a sarafloxacina. Para tal efeito, as constantes de ionização foram determinadas por um método baseado em espectrofotometria de absorção molecular UV-visível e os perfis de distribuição de microespécies foram estabelecidos para cada fluoroquinolona, em função do pH. A lipofilicidade destes compostos foi quantificada recorrendo aos coeficientes de partição, aparente e verdadeiro, de cada princípio activo num sistema 1-octanol/solução aquosa. Verificou-se que para as fluoroquinolonas, tal como para outros compostos anfotéricos, o coeficiente de partição aparente é máximo na zona de pH próxima do ponto isoeléctrico de cada composto. Aplicando o conceito de par iónico determinou-se o coeficiente de partição aparente de cada fluoroquinolona, em função do pH na presença de vários contra-íões orgânicos, nomeadamente o ião acetato, mesilato, deoxicolato e hidrogenomaleato. Dos resultados obtidos conclui-se que é possível manipular a lipofilicidade destes fármacos, no sentido de melhorar a sua afinidade com meios orgânicos, como os que constituem as membranas celulares, numa vasta gama de pH.

keywords

fluoroquinolone, lipophilicity, partition coefficient, ionic pair, counter ion.

abstract

Fluoroquinolones are an important class of synthetic antibacterial agents with an enormous therapeutic potential. These antibacterial agents have a broad spectrum of activity that includes gram-negative, gram-positive, aerobic and anaerobic bacteria species. Their pharmacokinetic properties allow high tissue and plasma distribution, chemical and biological stability and a relatively low incidence of side effects. The antibacterial activity of these compounds depends on the pH of the medium and also of its lipophilicity. Thus, to better understand the structure/activity relationship of these compounds it is important to know the acid-base properties, the protonation equilibrium and lipophilicity.

The main objective of this work is to improve the lipophilicity of two fluoroquinolones, moxifloxacin and sarafloxacin using the ion-pair effect. The ionization constants were determined by a spectrophotometric method and the distribution profiles of the microspecies were established for each fluoroquinolone, as a function of pH. The lipophilicity was quantified in the form of the apparent and true partition coefficient of each active principle in 1-octanol/water. For fluoroquinolones, as for other amphoteric compounds, the apparent partition coefficient is maximum around isoelectric point of each compound. Using the ion-pair concept, the apparent partition coefficient as a pH function, was determined in the presence of several organic counter ions, namely: acetate ion, mesylate ion, deoxycholate ion and hydrogenomaleate. The results indicate the possibility of manipulating the lipophilicity of these active pharmaceutical ingredients, in order to enhance their affinity towards organic media like cellular membranes, in a wide pH range.

Índice

Nomenclatura

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

1.	Introdução	1
1.1.	Introdução Geral	3
1.1.1.	Estrutura e Actividade das Quinolonas	5
1.1.2.	Mecanismos de Acção e Aplicações Terapêuticas	8
1.2.	Propriedades da Moxifloxacina e da Sarafloxacina	10
1.3.	Coeficiente de Partição	16
1.3.1.	Métodos Experimentais de Medida do Coeficiente de Partição	17
1.3.2.	Determinação do Coeficiente de Partição de Fluoroquinolonas	20
1.4.	Conceito de Par-iónico	21
1.5.	Objectivos do Trabalho	25
2.	Métodos Experimentais	27
2.1.	Materiais	29
2.2.	Métodos Experimentais	30
2.2.1.	Determinação das Constantes de Ionização	30
2.2.2.	Determinação das Rectas de Calibração	30
2.2.3.	Determinação do Coeficiente de Partição Aparente	31
2.2.4.	Determinação do Coeficiente de Partição Aparente na Presença de	32
	Contra-íões	32
3.	Resultados Experimentais e Discussão	33
3.1.	Determinação das Constantes de Ionização	35
3.2.	Determinação do Coeficiente de Partição	41
3.2.1.	Coeficiente de Partição Aparente	41
3.2.2.	Coeficiente de Partição Verdadeiro	45
3.3.	Coeficiente de Partição Aparente na Presença de Contra-íões	47
4.	Conclusões	57
4.1.	Conclusões e Notas Finais	59
4.2.	Trabalho Futuro	60

5.	Apêndices.....	63
	Apêndice A – Rectas de calibração	65
6.	Referências Bibliográficas	67

Nomenclatura

A_i	Valor da absorvância da fase aquosacantes do equilíbrio de partição
A_f	Valor da absorvância da fase aquosa depois do equilíbrio de partição
A_o	Valor da absorvância da fase orgânica depois do equilíbrio de partição
$A_{(COOH)}$	Valor da absorvância quando o grupo carboxílico está protonado
$A_{(COO^-)}$	Valor da absorvância quando o grupo carboxílico está desprotonado
$A_{(pH)}$	Valor da absorvância do grupo carboxílico para um valor específico de pH
Abs	Absorvância
Ac	Ião acetato
C_i	Átomo de carbono na posição i , na estrutura genérica da fluoroquinolona
Doc	Ião deoxicolato
HQ^\pm	Espécie anfotérica de fluoroquinolona
HQ^0	Espécie neutra de fluoroquinolona
H_2Q^+	Espécie catiónica de fluoroquinolona
Hmal	Ião hidrogenomaleato
K_{ow}	Coefficiente de partição verdadeiro
K_1 e K_2	Macroconstantes de ionização
$k_{11}, k_{12}, k_{21}, k_{22}$	Microconstantes de ionização
m_i	Massa de fluoroquinolona na fase aquosa, antes de se atingir o equilíbrio de partição
m_f	Massa de fluoroquinolona na fase aquosa, depois de se atingir o equilíbrio de partição
m_o	Massa de fluoroquinolona na fase orgânica, depois de se atingir o equilíbrio de partição
m_o^{bm}	Massa de fluoroquinolona na fase orgânica determinada por balaço de massa
Mes	Ião mesilato
P_{app}	Coefficiente de partição aparente

pI	ponto isoeléctrico
Q^-	Espécie aniónica de fluoroquinolona
R_i	Grupo substituinte do carbono i , na estrutura genérica da fluoroquinolona
X_8	Grupo substituinte do carbono 8, na estrutura genérica da fluoroquinolona
Y^-	Contra-íão

Símbolos Gregos

λ	comprimento de onda
$\alpha_{(COO^-)}$	Fracção de desprotonação do grupo carboxílico
α_{exp}	Fracção de desprotonação do grupo carboxílico calculada pela eq. (3.1)
α_{calc}	Fracção de desprotonação do grupo carboxílico calculada pela eq. (3.2)

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Características das diferentes gerações das fluoroquinolonas ^[9]	5
Tabela 1.2: Constantes de ionização da moxifloxacina ^[16] e da sarafloxacina ^[17]	14
Tabela 2.1: Compostos usados neste trabalho, a sua origem e pureza.	29
Tabela 2.2: Comprimentos de onda usados para cada fluoroquinolona.	31
Tabela 3.1: Constantes de ionização determinadas neste trabalho.	38
Tabela 3.2: Absorvâncias e massas de moxifloxacina a diferentes pH em ambas as fases.	42
Tabela 3.3: Absorvâncias e massas de sarafloxacina a diferentes pH em ambas as fases..	42
Tabela 3.4: Coeficiente de partição aparente para a moxifloxacina e para a sarafloxacina, a diferentes pH.	43
Tabela 3.5: Valores de Papp e respectivos desvio-padrão (D.P.) da moxifloxacina, na ausência e na presença de contra-íões.....	48
Tabela 3.6: Valores de Papp e respectivos desvio-padrão (D.P.) da sarafloxacina, na ausência e na presença de contra-íões.....	48
Tabela 3.7: Valores de Papp na presença de contra-íões, para a moxifloxacina e sarafloxacina.	52
Tabela 5.1: Rectas de calibração e respectivos valores do coeficiente de correlação para moxifloxacina.	63
Tabela 5.2: Rectas de calibração e respectivos valores do coeficiente de correlação para sarafloxacina.	63

Lista de Figuras

Figura 1.1: Estruturas: (a) Fluoroquinolona (b) Anel de naftiridina.	6
Figura 1.2: Estruturas dos antibióticos: (a) moxifloxacina.HCl e (b) sarafloxacina.HCl.	10
Figura 1.3: Equilíbrio de protonação da moxifloxacina ^[16]	11
Figura 1.4: Equilíbrio de protonação da sarafloxacina.	12
Figura 1.5: Diagrama de distribuição das microespécies de moxifloxacina ^[16]	15
Figura 1.6: Definição de Coeficiente de Partição, onde X representa o soluto ^[26]	16
Figura 1.7: Estruturas dos contra-íons: a) íon acetato, b) íon deoxicolato, c) íon mesilato e d) íon hidrogenomaleato.	24
Figura 3.1: Espectros da moxifloxacina para diferentes valores de pH.	35
Figura 3.2: Espectros da sarafloxacina para diferentes valores de pH.	36
Figura 3.3: Fracção de desprotonação em função do pH. (a) moxifloxacina a 300,0 nm, (b) sarafloxacina a 284,0 nm. A linha corresponde aos $\alpha(\text{COO}^-)$ calculados pelo método iterativo.	38
Figura 3.4: Diagrama de distribuição das microespécies de sarafloxacina.	40
Figura 3.5: Perfil de partição aparente da moxifloxacina em função do pH.	44
Figura 3.6: Perfil de partição aparente da sarafloxacina em função do pH.	44
Figura 3.7: Distribuição de partição em função do pH, para a moxifloxacina, a linha representa a previsão de $\log(\text{Papp})$	46
Figura 3.8: Distribuição de partição em função do pH, para a sarafloxacina, a linha representa a previsão de $\log(\text{Papp})$	47
Figura 3.9: Influência dos contra-íons no Papp da moxifloxacina em função do pH.	49
Figura 3.10: Influência dos contra-íons no Papp da sarafloxacina em função do pH.	50
Figura 3.11: Efeito da razão molar no Papp da moxifloxacina, pH = 5,0.	52
Figura 3.12: Efeito da razão molar no Papp da moxifloxacina, pH = 7,0.	53
Figura 3.13: Efeito da razão molar no Papp da sarafloxacina, pH = 3,0.	53
Figura 3.14: Efeito da razão molar no Papp da sarafloxacina, pH = 5,0.	54
Figura 3.15: Efeito da razão molar no Papp da sarafloxacina, pH = 7,0.	54

1. Introdução

1.1. Introdução Geral

As fluoroquinolonas são uma classe de compostos que pertencem a um vasto grupo de agentes antimicrobianos sintéticos. Actualmente as fluoroquinolonas representam a maior classe de agentes antimicrobianos com o maior potencial terapêutico. Isto deve-se essencialmente, ao facto de serem compostos sintéticos que facilmente podem ser manipulados, no sentido de melhorar a relação estrutura/actividade, aumentando a potência global do antibiótico. Da mesma forma, os efeitos secundários podem ser reduzidos ou mesmo eliminados. Por estas razões as fluoroquinolonas apresentam todos os atributos para constituírem uma classe de agentes antimicrobianos ideais ^[1]: doses orais e parentais baixas; um amplo espectro de actividade que abrange microorganismos gram-negativos, gram-positivos, aeróbios e anaeróbios; boa distribuição ao nível dos tecidos e plasma; estabilidade química e biológica e baixa incidência de efeitos secundários.

A descoberta destes compostos é relativamente recente. Apenas no início dos anos sessenta, durante a síntese da cloroquina como agente antimalárico, foi isolado pela primeira vez um subproduto que apresentava actividade antibacteriana ^[2]. Este subproduto depois de modificado deu origem ao primeiro composto da classe das quinolonas, o ácido nalidíxico. Este composto apresentava actividade contra microorganismos gram-negativos e começou a ser comercializado nos Estados Unidos da América em 1963, no tratamento de infecções do sistema urinário ^[3]. No entanto, a sua aplicação clínica foi muito limitada pois verificou-se que um elevado número de microorganismos desenvolvia, facilmente, resistência ao antibiótico ^[3, 4]. Nos anos setenta, outras quinolonas foram desenvolvidas, como o ácido oxolínico e a cinoxacina, mas tais compostos não apresentaram uma vantagem significativa em relação ao ácido nalidíxico, em termos de espectro de actividade, propriedades farmacocinéticas e respectiva aplicação clínica ^[4, 5]. Nesse mesmo período a síntese do ácido pipemídico, com a inclusão de um grupo piperazinilo melhorou substancialmente a actividade das quinolonas contra microorganismos gram-negativos apresentando mesmo alguma actividade contra microorganismos gram-positivos representando, assim um importante avanço nesta área ^[4]. Nos anos 80, através de alterações na estrutura molecular do ácido pipemídico, como a introdução de um átomo de flúor, foi possível sintetizar a norfloxacin, tendo este sido o primeiro composto comercial do grupo das fluoroquinolonas ^[4, 6]. As fluoroquinolonas apresentaram um espectro de

actividade mais amplo que as primeiras quinolonas, devido à introdução do átomo de flúor permitindo uma melhor penetração destes compostos nas células bacterianas, facilitando a ligação à enzima DNA-girase, inibindo a replicação e transcrição do DNA bacteriano [6, 7].

O desenvolvimento e estudo de novos agentes antibacterianos é uma área de investigação onde as grandes descobertas e evoluções podem ser fácil e rapidamente superadas por pequenas modificações estruturais que dão origem a novos compostos mais eficientes. Este foi o caso da norfloxacin que veio iniciar uma nova geração de fluoroquinolonas. Nesta 2ª geração procurava-se aperfeiçoar a relação estrutura/actividade dos compostos desenvolvidos, de maneira a aumentar o espectro de actividade e optimizar as suas propriedades farmacocinéticas, enquanto simultaneamente se tentava reduzir os seus efeitos secundários [8]. Assim, os compostos desta geração apresentam maior actividade contra microorganismos gram-negativos como *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* e ainda alguma actividade contra microorganismos gram-positivos *Coccus*. As alterações estruturais associadas a esta geração de fluoroquinolonas promoveram a absorção oral e o aumento da distribuição sistémica no organismo. Entre os compostos da 2ª geração destacam-se a ciprofloxacina e a ofloxacina, como sendo duas das fluoroquinolonas com maior potência global e logo com maior aplicação terapêutica. No entanto, e tal como já tinha acontecido com os compostos da 1ª geração, algumas espécies de microorganismos como por exemplo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, desenvolveram resistência a alguns destes compostos [4, 5, 8].

Na 3ª geração de fluoroquinolonas, as características favoráveis da 2ª geração foram mantidas, e a actividade contra microorganismos gram-positivos, como *Pneumococci sp.*, contra microorganismos anaeróbios e ainda contra estirpes resistentes às fluoroquinolonas anteriores, foi aumentada significativamente. Esta geração apresenta excelente absorção oral, tal como acontecia com a geração anterior, e tempos de meia-vida suficientemente longos, permitindo apenas uma a duas doses diárias. Nesta geração destacam-se a levofloxacina e a sparfloxacina com sendo os compostos com maior aplicação terapêutica [4, 5, 7, 8].

A 4ª geração de fluoroquinolonas é a que apresenta compostos com vantagens mais significativas, como são exemplo a clinafloxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina e sarafloxacina. Estes compostos mantiveram a excelente actividade da ciprofloxacina contra microorganismos gram-negativos, mas melhoraram a actividade

contra *Pseudomonas aeruginosa*, e contra outras espécies não fermentativas, todos eles apresentando excelente actividade contra espécies gram-positivas e contra microorganismos anaeróbios ^[4, 8].

Na Tabela 1.1 resumem-se as características principais de cada uma das gerações de fluoroquinolonas descritas.

Tabela 1.1: Características das diferentes gerações das fluoroquinolonas ^[9].

Geração	Fluoroquinolonas	Características
1 ^a	Ácido nalidíxico Ácido oxolínico Cinoxacina Ácido pipemídico	Moderada actividade contra espécies gram-negativas; Aplicação predominante no aparelho urinário.
2 ^a	Norfloxacin Ciprofloxacina Ofloxacina Enrofloxacin Enoxacin	Excelente actividade contra espécies gram-negativas; Actividade contra espécies gram-positivas muito limitada; Aplicações nos aparelhos urinário, respiratório, gastrointestinal, sexual e em infecções da pele e ossos.
3 ^a	Orbifloxacina Levofloxacina Sparfloxacina Grepafloxacina	Actividade contra espécies gram-negativas igual à 2 ^a geração, excepto contra <i>P. aeruginosa</i> que é inferior; Boa actividade contra espécies gram-positivas e espécies anaeróbias; Actividade contra estirpes resistentes à 2 ^a geração; Aplicações idênticas às da 2 ^a geração, com maior destaque nas infecções do aparelho respiratório.
4 ^a	Trovafloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina Gemifloxacina Sitafloxacina Sarafloxacina	Actividade contra espécies gram-negativas igual à 2 ^a geração; Excelente actividade contra espécies gram-positivas, espécies anaeróbias e estirpes resistentes. Aplicações idênticas às da 2 ^a geração, com excelentes resultados nas infecções do aparelho respiratório.

1.1.1. Estrutura e Actividade das Quinolonas

Com mais de 800 milhões de doentes tratados em todo o mundo, as quinolonas são actualmente uma das principais classes de agentes antimicrobianos. As suas indicações terapêuticas evoluíram bastante, desde os anos sessenta até aos nossos dias, desde

infecções urinárias até um elevado número de infecções nas mais diversas partes do corpo humano ^[8]. Esta evolução só se tornou possível tendo por base um sólido conhecimento da relação estrutura/actividade para esta classe de moléculas, e a sua relação com as propriedades farmacocinéticas ^[10].

A estrutura genérica de uma fluoroquinolona é apresentada na Figura 1.1 ^[1]. As estruturas das quinolonas evoluíram por dois caminhos distintos originando:

- as naftiridonas, as quais mantêm o anel de naftiridina original do ácido nalidíxico, com átomos de azoto na posição 1 e na posição 8 (Figura 1.1 (b)) sendo exemplos a enoxacina, a trovafloxacinina e a gemifloxacinina,
- as fluoroquinolonas, com apenas um átomo de azoto na posição 1, tais como a ciprofloxacina, a sparfloxacina e a moxifloxacina ^[9].

Todas as quinolonas têm em comum um grupo cetona na posição 4, um grupo carboxílico na posição 3 e um átomo de flúor na posição 6 ^[1, 4, 11].

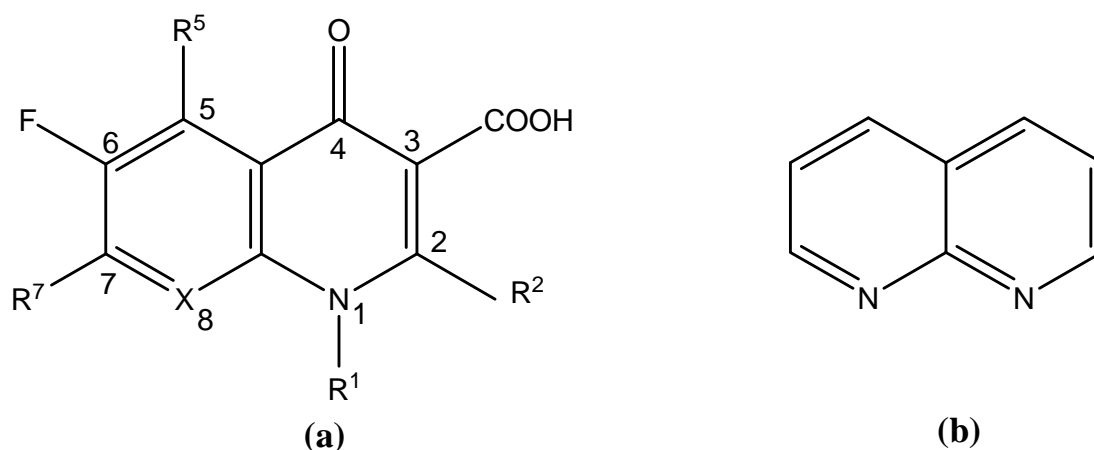


Figura 1.1: Estruturas: (a) Fluoroquinolona (b) Anel de naftiridina.

Os grupos cetona e carboxílico são responsáveis pela ligação entre a molécula e a DNA da célula bacteriana; por outro lado, o flúor na posição 6 é essencial na penetração destas moléculas no interior das células e portanto está directamente relacionado com o aumento da potência antibacteriana destes compostos. Como a posição 2 está muito próxima do local de ligação à DNA-girase, R2 deve ser um átomo pequeno, normalmente de hidrogénio ^[1, 4]. Qualquer alteração nas posições 2, 3, 4 e 6 reduz, consideravelmente a eficácia antibacteriana ^[1].

Na posição 1, o grupo substituinte R_1 que se liga ao átomo de azoto influencia também a potência global do composto. Nos primeiros compostos (ácido nalidíxico, ácido pipemídico, norfloxacin, ...), R_1 era um grupo etílico, mas verificou-se que grupos mais volumosos aumentavam significativamente a actividade contra microorganismos gram-negativos e gram-positivos ^[4]. Um dos grupos mais comuns nesta posição é o ciclopropilo, o qual está presente em muitos dos compostos desenvolvidos e comercializados, como por exemplo a ciprofloxacina, a sparfloxacina, a moxifloxacina e a gemifloxacina. Esta posição pode também ser ocupada por um anel 2,4-difluorofenilo como por exemplo na trovafloxacina, apresentando também um aumento considerável da actividade contra microorganismos gram-positivos ^[1, 4].

Na posição 5, o grupo substituinte R_5 está essencialmente relacionado com a actividade contra microorganismos gram-positivos, embora, como já foi referido, esta actividade dependa também de grupos substituintes em outras posições, nomeadamente R_1 . Verificou-se que grupos volumosos nesta posição diminuíam a actividade do fármaco, sendo R_5 normalmente um átomo de hidrogénio, um grupo metilo ou ainda um grupo amina ^[1, 4].

O substituinte R_7 na posição 7 tem um enorme efeito na potência, no espectro de actividade e ainda nas propriedades farmacocinéticas das quinolonas. É normal encontrar-se nesta posição anéis heterocíclicos de azoto, de cinco e seis membros. O azoto presente nestes anéis é essencial para que se obtenha uma boa eficácia oral dos compostos. Os grupos mais comuns são os piperazinilos, presentes desde as primeiras quinolonas como o ácido pipemídico, a norfloxacin e a ciprofloxacina, as quais apresentam actividade contra microorganismos gram-negativos. Os grupos amino-pirrolidinilos e os piperazinilos substituídos, apresentam uma maior potência contra microorganismos gram-positivos, sendo exemplos de fluoroquinolonas com estes grupos a tosufloxacina, a grepafloxacina, a ofloxacina e a sparflofaxina ^[1, 4]. Um outro tipo de substituinte R_7 é um anel bicíclico, que se pode encontrar na moxifloxacina (que tem um anel diazabicyclononilo) e na trovafloxacina (que tem um azabicyclononilo), ambas apresentando boa actividade contra microorganismos gram-positivos ^[4].

Os substituintes de X_8 influenciam a eficácia do composto *in vivo* e a actividade antibacteriana, principalmente, contra microorganismos anaeróbios. Nas naftiridonas X é um átomo de azoto (Figura 1.1) enquanto que nas fluoroquinolonas X é um átomo de

carbono que ao ligar-se a átomos de halogéneos, nomeadamente o cloro e o flúor, favorece a actividade antibacteriana, embora torne o composto menos estável e aumente a fototoxicidade ^[11]. Uma boa alternativa é utilizar um átomo de carbono ligado a um grupo metoxilo, aumentando a actividade contra microorganismos anaeróbios sem aumentar o risco de fototoxicidade, sendo disso exemplos a moxifloxacina e a gatifloxacina ^[1, 4].

1.1.2. Mecanismos de Acção e Aplicações Terapêuticas

A replicação do DNA das células bacterianas é controlada por um grupo de enzimas denominadas topoisomerases. Estas enzimas garantem que a molécula de DNA se mantém sempre na sua posição enrolada, mesmo quando se está a replicar ^[3, 8].

Entre os compostos antibacterianos com uso terapêutico, as fluoroquinolonas são o único grupo que actua ao nível das topoisomerases sem apresentar grandes limitações na actividade antibacteriana ou na toxicidade ^[7, 12, 13]. As fluoroquinolonas inibem a síntese do DNA bacteriano ao ligarem-se às enzimas topoisomerase II (ou DNA-girase) e topoisomerase IV, formando um complexo ternário [fármaco-enzima-DNA]. Em geral, nas espécies gram-negativas, as fluoroquinolonas ligam-se principalmente à DNA-girase enquanto que nas espécies gram-positivas ligam-se principalmente à topoisomerase IV ^[3, 8].

As excelentes propriedades farmacocinéticas destes compostos têm contribuído para o sua extensa utilização em medicina. As fluoroquinolonas apresentam excelente absorção gastrointestinal pelo que, formulações orais têm sido desenvolvidas para todos os compostos em uso corrente. No entanto, formulações intravenosas estão disponíveis para alguns compostos com largo espectro de actividade, como por exemplo a ciprofloxacina e a ofloxacina, facilitando a sua aplicação em tratamentos hospitalares. Estes compostos distribuem-se por vastas áreas do corpo humano e concentram-se em determinados fluidos e tecidos em níveis superiores aos encontrados no plasma sanguíneo, nomeadamente, na urina, nos rins, na próstata, fezes, bÍlis e pulmões. As concentrações de composto na saliva, em secreções dos brônquios, nos ossos e no fluido cérebro-espinal são inferiores às encontradas no plasma sanguíneo, mas em alguns casos, são suficientes para o tratamento de infecções ^[8, 12]. O tempo de meia-vida no plasma é suficientemente longo permitindo

estabelecer doses de uma a duas vezes por dia ^[5, 12], o que não acontece com outros antibióticos.

A eliminação destes fármacos é feita, essencialmente, por duas vias, pela via renal e/ou pela via hepática. As fluoroquinolonas são geralmente bem toleradas causando efeitos secundários em apenas 1-3 % dos doentes, sendo os mais comuns a intolerância gastrointestinal, reacções alérgicas e reacções de foto-sensibilidade, principalmente, nas fluoroquinolonas que têm um átomo de flúor na posição X₈ (Figura 1.1) ^[12].

As fluoroquinolonas têm demonstrado excelentes resultados clínicos, no tratamento de infecções do aparelho urinário, infecções transmitidas sexualmente, infecções gastrointestinais, da pele, dos ossos e do aparelho respiratório. São igualmente administradas a animais como aditivos alimentares e/ou como agentes terapêuticos ^[3, 14]. Contudo, e como consequência da vasta aplicabilidade das fluoroquinolonas tanto em seres humanos como em animais, diversos microorganismos têm vindo a desenvolver mecanismos de resistência a este tipo de fármacos.

São dois os mecanismos mais usuais na resistência bacteriana:

- i) Mutações nas topoisomerases (DNA-girase e topoisomerase IV), as quais diminuem a afinidade entre a fluoroquinolona e a enzima, não se formando o complexo [fármaco-enzima-DNA], sendo desta forma possível a replicação do DNA;
- ii) mutações no acesso às enzimas, isto é, alterações estruturais na membrana externa das células bacterianas e activação de bombas de efluxo no interior das células. Desta forma, a concentração de fluoroquinolona no interior da célula diminui consideravelmente, diminuindo a eficácia do fármaco. Este último mecanismo é menos específico que o primeiro, desenvolvendo muitas vezes resistência a múltiplas classes de antimicrobianos ^[3, 5, 8].

A resistência bacteriana tem-se manifestado como um problema mundialmente crescente, tornando muitas classes de compostos antibacterianos ineficazes, com consequências importantes para a saúde pública. Parte deste problema está relacionado com o uso intensivo ou mesmo inadequado destes fármacos ^[15]. Diversos estudos

realizados têm demonstrado que existe uma relação directa entre o aumento de resistência às fluoroquinolonas e o seu consumo. Assim, de forma a preservar a sua actividade, deve-se garantir que estes fármacos são usados apenas quando estritamente necessários e em doses adequadas ^[3].

1.2. Propriedades da Moxifloxacina e da Sarafloxacina

Este trabalho centra-se no estudo de duas fluoroquinolonas da 4^a geração nomeadamente a moxifloxacina, com aplicações terapêuticas em seres humanos e a sarafloxacina com maior aplicabilidade em veterinária.

A moxifloxacina é uma fluoroquinolona que na sua estrutura apresenta, na posição 1 um grupo ciclopropilo, na posição 7 um grupo diazabiclononilo, que lhe confere boa actividade contra microorganismos gram-positivos, e na posição 8 um grupo metoxilo, como se pode ver na Figura 1.2 (a) ^[16].

A sarafloxacina tem na sua estrutura um grupo aromático, 4-fluorofenilo, na posição 1 e um grupo piperazinilo na posição 7 estando a sua estrutura representada na Figura 1.2 (b) ^[17, 18]. Muitos antibióticos são usados na forma hidrociorada, como é o caso da sarafloxacina.HCl e da moxifloxacina.HCl, por forma a proporcionar um aumento da solubilidade do fármaco em sistemas aquosos, como por exemplo os fluidos corporais, devido à presença de cargas em solução ^[19].

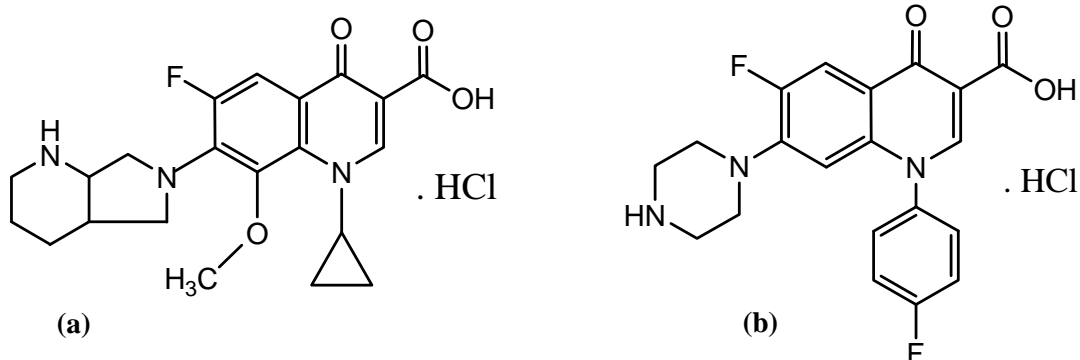


Figura 1.2: Estruturas dos antibióticos: (a) moxifloxacina.HCl e (b) sarafloxacina.HCl.

A sarafloxacin e a moxifloxacin são ambas moléculas anfotéricas, ou seja, podem comportar-se como ácidos ou como bases, mediante o pH do meio em que se encontrem. Sabe-se que a actividade antibacteriana deste tipo de compostos depende muito do pH, uma vez que eles actuam por inibição do DNA-girase da bactéria através do grupo ácido que todas as fluoroquinolonas apresentam na posição 3^[7]. Assim, para melhor se compreender a relação estrutura/actividade destes compostos é necessário conhecer as suas propriedades ácido-base, as constantes de ionização e o respectivo equilíbrio de protonação.

Ambas apresentam um grupo com características básicas na posição 7 (grupo que contém uma amina secundária) e um grupo com características ácidas na posição 3 (grupo com um ácido carboxílico)^[11, 16, 20]. Por serem moléculas dipróticas, em solução aquosa podem existir sob a forma de quatro microespécies: espécie positiva (H_2Q^+), espécie anfotérica (HQ^+), espécie neutra (HQ^0) e espécie negativa (Q^-)^[16, 20, 21]. Os equilíbrios de protonação da moxifloxacin e da sarafloxacin são apresentados, respectivamente, na Figura 1.3 e na Figura 1.4.

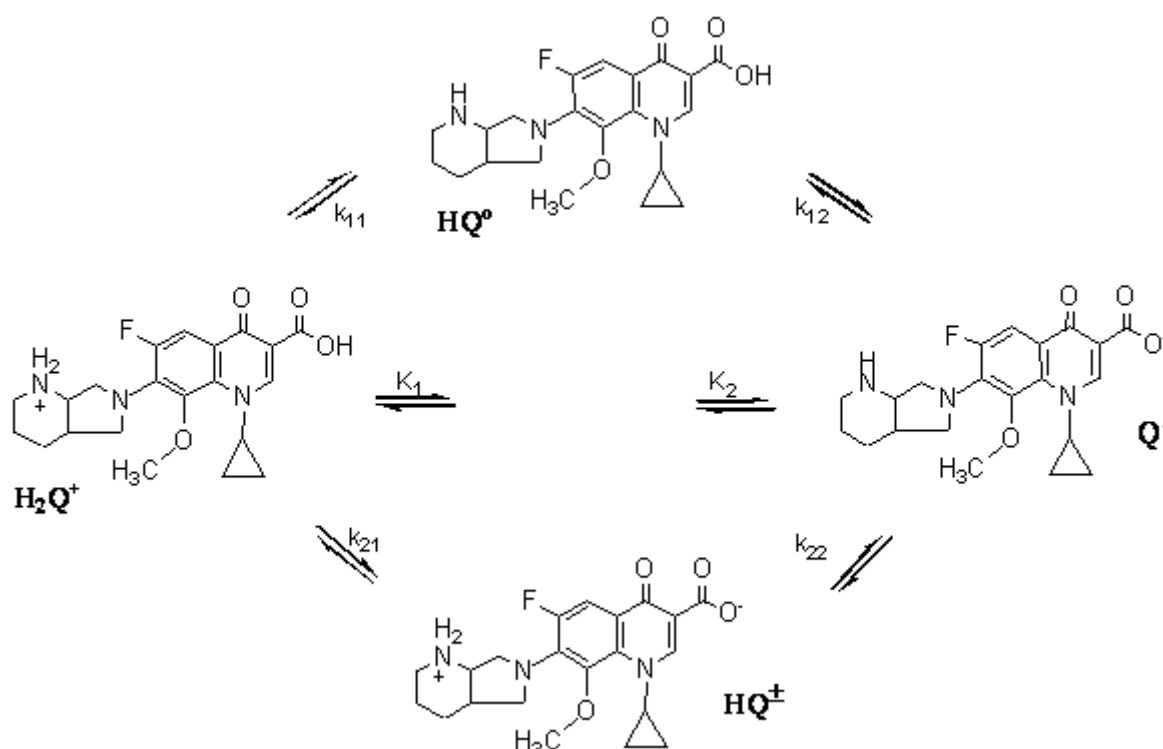


Figura 1.3: Equilíbrio de protonação da moxifloxacin^[16].

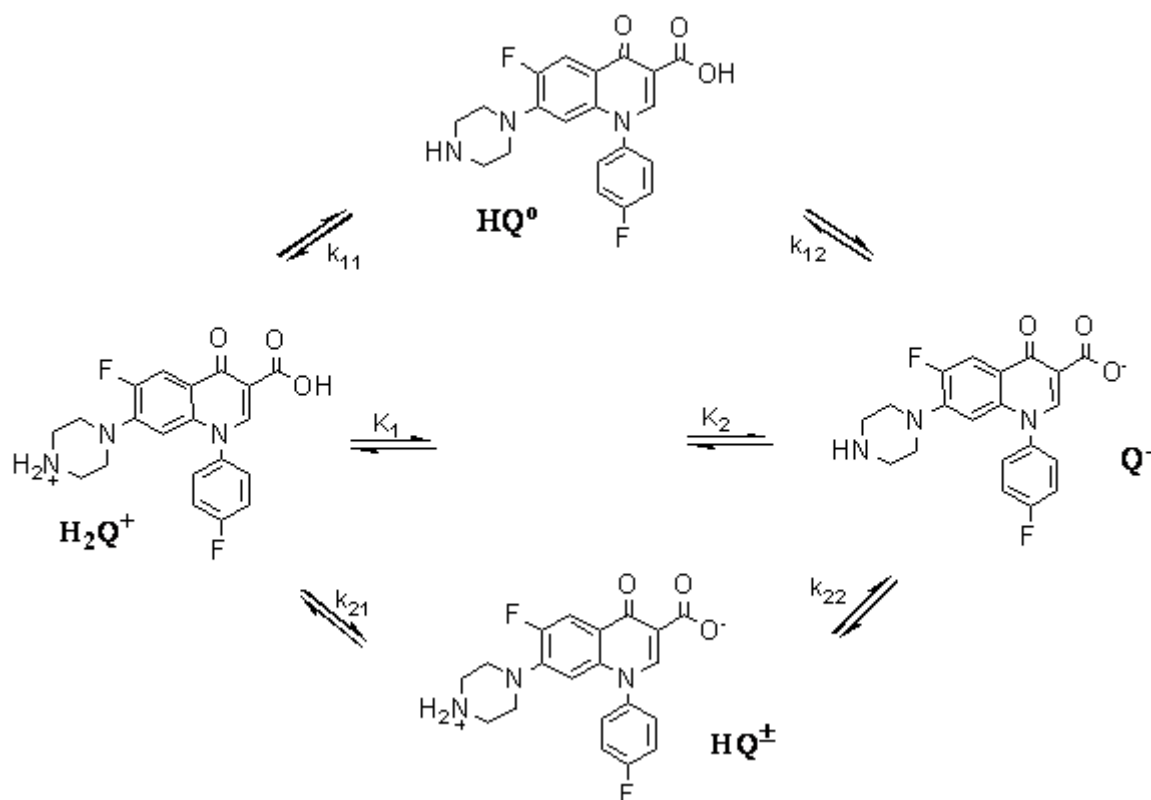


Figura 1.4: Equilíbrio de protonação da sarafloxacin.

Através da análise das Figura 1.3 e Figura 1.4, é possível escrever as expressões das constantes de ionização macroscópicas, K_1 e K_2 destes compostos ^[16, 20]:

$$K_1 = \frac{\{[HQ^\pm] + [HQ^0]\} [H^+]}{[H_2Q^+]} \quad (1.1)$$

$$K_2 = \frac{[Q^-][H^+]}{\{[HQ^\pm] + [HQ^0]\}} \quad (1.2)$$

Da mesma forma, também é possível escrever as expressões das constantes de ionização microscópicas (k_{11} , k_{12} , k_{22} e k_{21}) que são ^[16]:

$$k_{11} = \frac{[HQ^o][H^+]}{[H_2Q^+]} \quad (1.3)$$

$$k_{12} = \frac{[Q^-][H^+]}{[HQ^o]} \quad (1.4)$$

$$k_{21} = \frac{[HQ^\pm][H^+]}{[H_2Q^+]} \quad (1.5)$$

$$k_{22} = \frac{[Q^-][H^+]}{[HQ^\pm]} \quad (1.6)$$

As relações entre as constantes macroscópicas e microscópicas são ^[16, 20]:

$$K_1 = k_{11} + k_{21} \quad (1.7)$$

$$\frac{1}{K_2} = \frac{1}{k_{12}} + \frac{1}{k_{22}} \quad (1.8)$$

$$\beta = K_1 K_2 = k_{11} k_{12} = k_{21} k_{22} \quad (1.9)$$

Conhecendo as constantes de ionização e a relação existente entre elas é possível determinar a concentração relativa das quatro microespécies em solução. Na Tabela 1.2 encontram-se os valores das constantes de ionização disponíveis na literatura, para as fluoroquinolonas em estudo ^[16, 17].

Tabela 1.2: Constantes de ionização da moxifloxacina^[16] e da sarafloxacina^[17].

	Macroconstantes		Microconstantes			
	pK ₁	pK ₂	pk ₁₁	pk ₁₂	pk ₂₁	pk ₂₂
Moxifloxacina	6,25 ± 0,02	9,29 ± 0,04	7,46	8,08	6,29	9,25
Sarafloxacina	4,10 ± 0,1	6,80 ± 0,1	---	---	---	---

A concentração relativa ou fracção molar de todas as espécies em solução é então dada pelas seguintes equações^[16]:

$$f[Q^-] = \frac{\beta}{\beta + K_1 [H^+] + [H^+]^2} \quad (1.10)$$

$$f[HQ^\pm] = \frac{k_{21}[H^+]}{\beta + K_1 [H^+] + [H^+]^2} \quad (1.11)$$

$$f[HQ^0] = \frac{k_{11}[H^+]}{\beta + K_1 [H^+] + [H^+]^2} \quad (1.12)$$

$$f[H_2Q^+] = \frac{[H^+]^2}{\beta + K_1 [H^+] + [H^+]^2} \quad (1.13)$$

O diagrama de distribuição da fracção molar de cada microespécie da moxifloxacina, em solução aquosa e em função do pH está representado na Figura 1.5^[16]. De acordo com a figura, verifica-se que para valores de pH próximos de 7,0 existe uma predominância das microespécies anfotérica e neutra, o que coincide com o ponto isoelectrico, (pI), da moxifloxacina, o qual pode ser determinado pela equação (1.14)^[22]. O

ponto isoelétrico da moxifloxacin com base nos valores das constantes de ionização da Tabela 1.2^[16] é igual a 7,8.

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad (1.14)$$

Para valores de pH ácidos a concentração das microespécies anfotérica e neutra diminui consideravelmente, tornando-se predominante a microespécie catiónica. Para valores de pH básicos a microespécie predominante é a aniónica.

Este tipo de diagramas ajuda a definir o estado de ionização da fluoroquinolona para um determinado valor de pH, o que por sua vez pode ajudar a compreender as diferenças existentes na absorção biológica destes compostos ^[13].

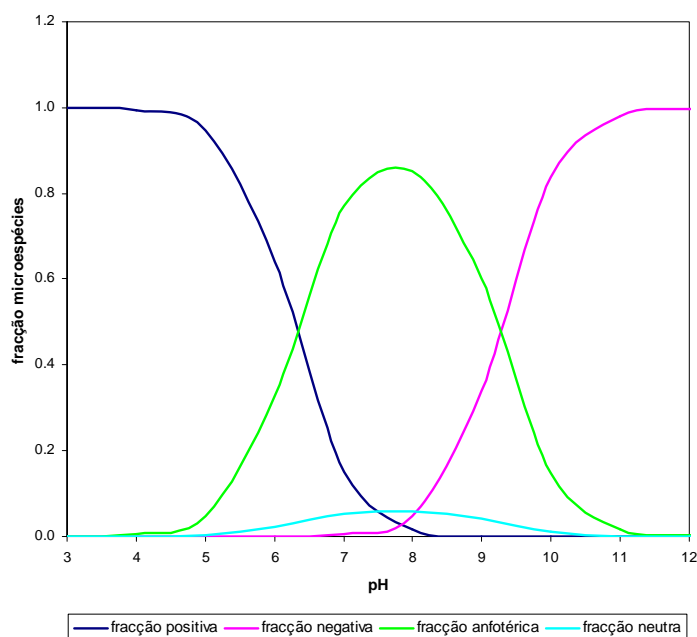


Figura 1.5: Diagrama de distribuição das microespécies de moxifloxacin ^[16].

Para a sarafloxacin, os dados de propriedades físico-químicas disponíveis na literatura são praticamente inexistentes e não foi possível encontrar valores para as microconstantes das microespécies em equilíbrio em solução aquosa. Sem esses dados não é possível representar o diagrama de distribuição das suas microespécies em função do pH.

No entanto, sabe-se que este tipo de diagrama difere consideravelmente entre as várias fluoroquinolonas ^[23, 24].

Conhecer as propriedades físico-químicas destes compostos é essencial para compreender o seu comportamento em seres vivos. Se por um lado a presença de espécies químicas ionizadas melhora a actividade biológica e a solubilidade em fluidos biológicos, por outro lado, espécies químicas não ionizadas favorecem a partição destes compostos em meios lipofílicos, como as membranas celulares dos microorganismos, melhorando as propriedades farmacocinéticas^[11].

1.3. Coeficiente de Partição

O conceito de distribuição de um soluto entre duas fases nas quais é solúvel tem sido um tema abordado desde sempre e em áreas diversas, como por exemplo, para isolar substâncias naturais como as essências de flores ^[25].

A razão de concentrações (ou fracções molares) do soluto distribuído entre dois solventes imiscíveis é constante após se atingir o equilíbrio, em condições de temperatura e pressão normais, tal como está representado na Figura 1.6. A esta razão de distribuição, praticamente insensível a variações de temperatura e concentração, denomina-se coeficiente de partição ou lei de partição ^[25, 26].

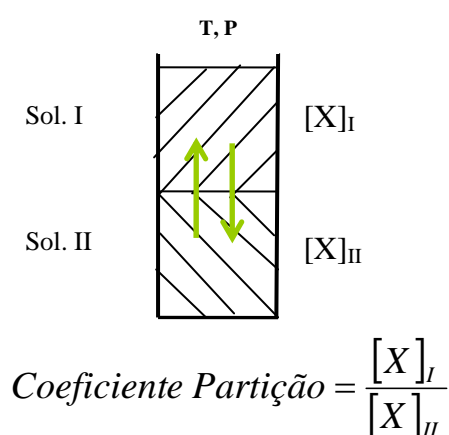


Figura 1.6: Definição de coeficiente de partição, onde X representa o soluto ^[26].

No entanto, para diversos sistemas esta lei não se verifica ^[26]. A distribuição do ácido benzóico entre o benzeno e a água é um exemplo clássico. O facto de haver formação de dímeros do ácido benzóico na fase do benzeno impossibilita a correcta determinação da distribuição do soluto nos solventes, pois existe mais do que uma espécie química em solução. O mesmo acontece na distribuição de substâncias que se ionizam em solução aquosa ^[26]. Assim, a lei de partição passou a ser definida tendo em conta a mesma espécie molecular em ambas as fases ^[25, 26].

Um dos sistemas mais utilizados na determinação do coeficiente de partição é o sistema 1-octanol/água. As suas propriedades físico-químicas permitem avaliar, embora de forma aproximada fenómenos ambientais (sorção, toxicidade, viabilidade biológica) que envolvem compostos orgânicos ^[27] e permitem ainda avaliar interacções entre compostos orgânicos e organismos vivos ^[26].

A água é um composto polar sendo portanto um bom solvente para solutos polares, isto é, que contêm grupos funcionais como: -OH, -CHO, -COOH, -NO₂ e NH₂. O 1-octanol é um hidrocarboneto de cadeia hidrofóbica, [CH₃(CH₂)₆CH₂OH], com um grupo álcool na extremidade que lhe confere características hidrofílicas nessa extremidade. O 1-octanol forma ligações por pontes de hidrogénio, tal com acontece com os fosfolípidos e as proteínas que normalmente se encontram nas membranas biológicas, podendo assim proporcionar uma boa aproximação ao ambiente físico-químico experimentado por uma substância química num teste em tecido vivo ^[26].

O coeficiente de partição de uma substância no sistema 1-octanol/água é representado por 'K_{ow}', também, vulgarmente, designado coeficiente de partição verdadeiro, por considerar a mesma espécie molecular em ambos os solventes, para soluções diluídas. Quando o coeficiente de partição é medido em condições em que o soluto está total ou parcialmente ionizado em solução aquosa, o coeficiente de partição representa-se por 'P_{app}', também designado por coeficiente de partição aparente ^[26].

1.3.1. Métodos Experimentais de Medida do Coeficiente de Partição

Os métodos experimentais para medir o coeficiente de partição estão normalmente divididos em métodos directos, nos quais a quantidade de soluto é determinada numa ou em ambas as fases de solvente, e métodos indirectos, onde não há análise quantitativa.

Nos métodos directos destacam-se os seguintes:

Método de Agitação – O soluto é inicialmente dissolvido numa das fases e através de agitação distribui-se pelas duas fases. Depois de separadas, a quantidade de soluto é analisada. Este método tem um procedimento experimental muito simples, no entanto para se obter elevada exactidão nos resultados, é necessário ter em consideração determinados detalhes como por exemplo:

- pureza dos solventes e do soluto, principalmente se as fases forem analisadas por espectrofotometria de absorção;
- concentração de soluto, que deve ser suficientemente baixa de modo a garantir a lei de Henry;
- a pré-saturação dos solventes, um no outro;

A agitação deve ser feita com um agitador orbital e deve-se evitar agitação muito forte, para minimizar a formação de emulsões. Depois da agitação as fases são sujeitas a centrifugação para a separação ser mais fácil e eficiente. A separação das fases deve ser feita com especial cuidado para não perturbar o equilíbrio de concentrações. Os dois métodos analíticos mais usados para a quantificação são a espectrofotometria (UV ou visível) e a cromatografia líquida^[26].

Método Estático – O procedimento é idêntico ao do método anterior mas sem agitação. Este método elimina qualquer possibilidade de formação de emulsões^[26].

Método de Agitação Lenta – É um método intermédio entre os dois métodos anteriores. Neste caso a agitação pode ser feita com barra magnética mas de uma forma muito lenta, evitando a formação de emulsões e a dispersão das fases uma na outra. A amostragem das duas fases deve ser feita com muito cuidado, para não perturbar o equilíbrio. É um método indicado para solutos muito hidrófobos^[26].

Método de Coluna – Com este método, as fases atingem o equilíbrio sem agitação ou risco de se formar emulsões. O soluto é dissolvido em 1-octanol e introduzido numa coluna de cromatografia, com enchimento de aproximadamente 100 mesh. Faz-se passar a fase aquosa pela coluna de forma a remover o soluto dissolvido no 1-octanol. Desta maneira,

consegue-se uma grande área de contacto entre as fases sem recorrer à agitação. A fase aquosa é normalmente analisada por cromatografia gasosa (GC) ou líquida (HPLC) [26].

Relativamente aos métodos indirectos, a maioria baseia-se em correlações dos factores de capacidade da cromatografia, por exemplo:

Cromatografia Líquida com Suporte Sólido – Este método é baseado no procedimento usual para a separação de substâncias por passagem em colunas com enchimento. Pode ser realizado na forma de coluna, de camada fina ou em suporte plano. A forma mais usada é a de coluna. Para as medições do coeficiente de partição, a coluna é empacotada com sílica gel muito fina (3-70 μm) com a qual os grupos de hidrocarbonetos estabelecem ligações covalentes. O eluente deve ser um solvente polar como a água ou uma solução tampão, capaz de retirar o soluto do substrato não polar. Em HPLC a afinidade do soluto pela fase estacionária é caracterizada pelo factor de capacidade k' [26],

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1.15)$$

onde t_R é o tempo de retenção do soluto e t_0 é o tempo de permanência da fase móvel na coluna. Relacionando a Equação (1.15) com K_{ow} obtém-se a correlação de Collander-type [26],

$$\log K_{ow} = a \log k' + b \quad (1.16)$$

onde a e b são constantes empíricas.

Cromatografia Líquida sem Suporte Sólido – Este método também se pode designar por cromatografia em contra corrente (CCC) e é baseado na extracção em contra corrente. Foram desenvolvidos muitos aparelhos para implementar este método mas todos se baseiam no mesmo princípio de funcionamento. A fase móvel, ou seja a menos densa, passa através da fase estacionária, mais densa, sob a forma de gotículas e tem que se garantir que o equilíbrio é atingido antes de as fases saírem do aparelho. É assim possível estabelecer a relação:

$$V_R = V_M + K_{ow} V_S = V_T + (K_{ow} - 1) V_S \quad (1.17)$$

onde, V é o volume e M , R , S e T indicam a fase móvel, de retenção, estacionária e total, respectivamente [26].

1.3.2. Determinação do Coeficiente de Partição de Fluoroquinolonas

O coeficiente de partição termodinâmico é descrito pela lei de distribuição:

$$K_d = \frac{a_{N_o}}{a_{N_{aq}}} \quad (1.18)$$

onde, K_d é o coeficiente de partição termodinâmico, a_{N_o} é a actividade da espécie neutra no 1-octanol e $a_{N_{aq}}$ é a actividade da espécie neutra na fase aquosa, em equilíbrio. Para soluções diluídas ($<10^{-4}$ M) as actividades podem ser desprezadas e substituídos por concentrações [28].

Tal como mencionado anteriormente, as fluoroquinolonas são moléculas anfotéricas que em solução aquosa se encontram ionizadas em quatro espécies diferentes. Assim, a sua concentração em solução aquosa é dada por [28]:

$$[HQ]_{(aq)} = [H_2Q^+]_{(aq)} + [HQ^\pm]_{(aq)} + [HQ^0]_{(aq)} + [Q^-]_{(aq)} \quad (1.19)$$

A maioria dos métodos analíticos usados na quantificação de fluoroquinolona no sistema de partição, mede a concentração total de soluto nas duas fases, sendo apenas possível determinar o coeficiente de partição aparente, P_{app} [28]:

$$P_{app} = \frac{[HQ^0]_{(o)}}{[H_2Q^+]_{(aq)} + [HQ^\pm]_{(aq)} + [HQ^0]_{(aq)} + [Q^-]_{(aq)}} \quad (1.20)$$

Apesar de em solução aquosa existir uma segunda espécie com carga eléctrica global nula, ficou demonstrado em estudos anteriores ^[29] que apenas a microespécie neutra consegue efectivamente distribuir-se pela fase orgânica. Tendo em consideração a lei de distribuição (1.18) pode-se redefinir a equação de P_{app} da seguinte forma:

$$P_{app} = \frac{[HQ^0]_{(o)}}{[HQ^0]_{(aq)}} \times \frac{[HQ^0]_{(aq)}}{[H_2Q^+]_{(aq)} + [HQ^\pm]_{(aq)} + [HQ^0]_{(aq)} + [Q^-]_{(aq)}} \quad (1.21)$$

ou seja,

$$P_{app} = K_{ow} \times f[HQ^0]_{(aq)} \quad (1.22)$$

O coeficiente de partição aparente fica definido em termos do coeficiente de partição verdadeiro e da fracção relativa da espécie neutra em solução.

A distribuição de espécies ionizadas na fase aquosa depende do pH e das constantes de ionização (K_1 , K_2 , k_{11} , k_{12} , k_{21} , k_{22}) como foi visto na secção 1.2. Combinando a equação (1.19) e (1.21) com as expressões das constantes de ionização (equações (1.1) a (1.6)) obtém-se uma expressão para o cálculo do coeficiente de partição verdadeiro ^[16, 21]:

$$K_{ow} = P_{app} \left(1 + \frac{k_{21}}{k_{11}} + \frac{k_{12}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{k_{11}} \right) \quad (1.23)$$

1.4. Conceito de Par-iónico

As fluoroquinolonas são moléculas hidrofílicas o que dificulta a sua absorção ao nível das membranas celulares (pele, mucosas e células bacterianas). Duas estratégias têm sido aplicadas no sentido de aumentar a capacidade de penetração de moléculas hidrofílicas através de membranas celulares ^[30, 31]:

(i) Ruptura da estrutura ordenada da camada lipídica da membrana, aumentando a solubilidade nessa camada.

(ii) Formação de pares iónicos entre iões de cargas opostas, que reduzem ou neutralizam a carga electrostática global aumentando assim a lipofilicidade da molécula sob a forma de par iónico, e consequentemente a sua capacidade de penetração através de membranas.

Um par iónico é definido como um par de iões de carga oposta que se mantêm unidos apenas por atracção electrostática que obedece à lei de Coulomb, o que significa que não existe qualquer tipo de ligação química. Experimentalmente um par iónico ($A^+ B^-$) comporta-se como uma espécie estável e com propriedades termodinâmicas distintas, como por exemplo, condutividade, comportamento cinético, propriedades osmóticas, entre outras ^[30, 32, 33].

A formação de um par iónico, é apenas possível se iões de carga oposta se aproximam e atingem uma distância de equilíbrio, dada pela seguinte equação ^[30, 33]:

$$d = \frac{|z^+ z^-| e^2}{2 \epsilon_r k T} \quad (1.24)$$

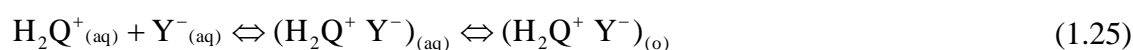
onde, z^+ e z^- são as cargas dos iões, e é a carga dos electrões, ϵ_r é a constante dieléctrica do meio, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

A equação (1.24) evidencia a importância da constante dieléctrica do meio na formação de pares iónicos. Um solvente com elevada constante dieléctrica, como por exemplo a água ($\epsilon_r = 78,5$), não favorece a formação de pares iónicos enquanto que, solventes com $\epsilon_r < 40,0$ favorecem a sua formação ^[33]. Outros factores podem estar envolvidos na associação dos iões nomeadamente, ligações de hidrogénio, lipofilicidade dos iões e parâmetros de solubilidade ^[33]. Nas soluções aquosas, para além das interacções electrostáticas, o solvente tem um efeito decisivo na formação dos pares iónicos, o qual foi descrito pela primeira vez em 1963 como “estrutura forçada da água” ^[34, 35]. Se o catião e o anião forem moléculas relativamente volumosas e hidrofóbicas, a estrutura de ligações por pontes de hidrogénio da água força-as a manterem-se unidas, de forma a maximizar as interacções água-água e minimizar perturbações na sua estrutura.

O conceito de par iónico tem sido aplicado na área das ciências farmacêuticas, com a finalidade de aumentar a lipofilicidade de fármacos com elevada afinidade com soluções aquosas, como são o exemplo dos compostos ionizados. Muitos fármacos de aplicação

tópica são moléculas ionizadas que apresentam fraca penetração através da camada lipídica do estrato córneo da pele. Estudos revelaram que por adição de contra-íões adequados é possível neutralizar parte da carga eléctrica dos fármacos e aumentar o fluxo de compostos através de membranas lipídicas ^[30, 32]. O conceito de par iónico foi também aplicado em compostos antibacterianos, como as cefalosporinas ^[34]. Estes antibióticos são administrados apenas por via intravenosa ou intramuscular por serem compostos anfotéricos muito hidrofílicos, apresentando fraca absorção oral. Na presença de contra-íões hidrofóbicos foi possível aumentar a lipofilicidade das cefalosporinas para valores de pH próximos do ponto isoelectrico de cada composto ^[34]. Outros compostos aos quais têm sido aplicado o conceito de par iónico são os peptídeos ^[33]. A aplicação do conceito de par iónico possibilita o aumento da lipofilicidade dos peptídeos sem ser necessário recorrer à modificação química dos mesmos, o que tem vantagens do ponto de vista biofarmaceutico, analítico e tecnológico, tanto na sua separação e determinação em amostras biológicas como na síntese de proteínas ^[33].

Aplicando o conceito de par iónico ao coeficiente de partição das fluoroquinolonas é possível estudar a sua influência na lipofilicidade destes fármacos. Em solução aquosa, as espécies positivas das fluoroquinolonas (H_2Q^+) podem associar-se a contra-íões negativos (Y^-) formando pares iónicos ($H_2Q^+ Y^-$) hidrofóbicos ^[34, 35],



Assim, a concentração de fluoroquinolona em solução aquosa passa a ser:

$$[HQ]_{(aq)} = [H_2Q^+]_{(aq)} + [HQ^\pm]_{(aq)} + [HQ^0]_{(aq)} + [Q^-]_{(aq)} + [H_2Q^+ Y^-]_{(aq)} \quad (1.26)$$

e por sua vez, o coeficiente de partição aparente é dado por:

$$P_{app} = \frac{[HQ^0]_{(o)} + [H_2Q^+ Y^-]_{(o)}}{[H_2Q^+]_{(aq)} + [HQ^\pm]_{(aq)} + [HQ^0]_{(aq)} + [Q^-]_{(aq)} + [H_2Q^+ Y^-]_{(aq)}} \quad (1.27)$$

Para este trabalho consideraram-se quatro contra-íons orgânicos, nomeadamente o mesilato, o acetato, o hidrogenomaleato e o deoxicolato com estruturas e propriedades moleculares muito distintas em termos de lipofilicidade (mesilato < acetato < hidrogenomaleato < deoxicolato), geometria, tamanho e flexibilidade (mesilato < acetato < hidrogenomaleato < deoxicolato) ^[35]. O íon deoxicolato e o íon hidrogenomaleato são substâncias endógenas, o íon mesilato é frequentemente usado como anião de fármacos, e o íon acetato encontra-se em muitos produtos alimentares com aromatizante. Na Figura 1.7 estão representadas as estruturas dos contra-íons estudados neste trabalho.

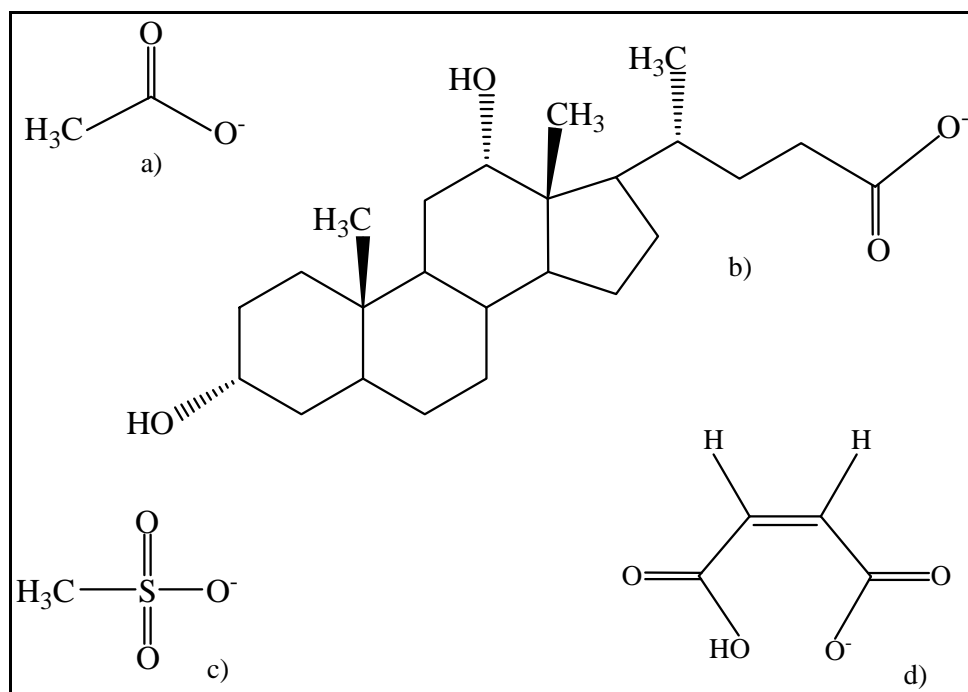


Figura 1.7: Estruturas dos contra-íons: a) íon acetato, b) íon deoxicolato, c) íon mesilato e d) íon hidrogenomaleato.

1.5. Objectivos do Trabalho

Considerando as propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas e o seu complexo equilíbrio de protonação, pretende-se com este trabalho determinar as constantes de ionização de duas fluoroquinolonas, a moxifloxacina e a sarafloxacina. Dessa forma, é possível conhecer detalhadamente a distribuição das microespécies de cada fluoroquinolona em função do valor de pH e estudar a sua influência na determinação do coeficiente de partição aparente e verdadeiro de cada fluoroquinolona. Este estudo é de especial importância para esta classe de fármacos, pois as suas estruturas moleculares variam consoante o pH do meio em que se encontram, alterando assim as suas propriedades farmacocinéticas. Pretende-se ainda, verificar qual a influência do de par iónico na lipofilicidade destas fluoroquinolonas. O coeficiente de partição aparente será determinado na presença de quatro contra-íões orgânicos com diferentes estruturas e propriedades moleculares e para cada um os resultados serão comparados com os valores do coeficiente de partição aparente obtidos para cada fluoroquinolona, na gama de pH estudada.

2. Métodos Experimentais

Neste capítulo será feita uma descrição dos compostos e materiais utilizados neste trabalho, assim como, dos procedimentos experimentais utilizados na determinação do coeficiente de partição aparente e na determinação da influência do par iônico.

2.1. Materiais

Para a realização deste trabalho foram usados vários compostos, nomeadamente, duas fluoroquinolonas (a moxifloxacina foi gentilmente cedida pela Bayer Health Care), os solventes, os contra iões e os sais e ácidos para as soluções tampão. Foi usada água ultra-pura de resistividade 18 MΩ.cm a 25,0 °C, sistema Millipore modelo Milli-Q element. Na Tabela 2.1 encontram-se listadas a origem de cada composto, assim como, a sua pureza. Todos os compostos foram usados sem qualquer purificação adicional.

Tabela 2.1: Compostos usados neste trabalho, a sua origem e pureza.

Composto	Fórmula molecular	Origem	Pureza
Moxifloxacina.HCl	$C_{21}H_{24}FN_3O_4.HCl$	Bayer HealthCare	99,8%
Sarafloxacina.HCl	$C_{20}H_{17}F_2N_3O_3.HCl$	LKT	98,0%
1-Octanol	$C_8H_{18}O$	Fluka	99,5%
Acetato de Sódio	$C_2H_3O_2Na$	Pronolab	99,8%.
Mesilato de Sódio	CH_3SO_3Na	Aldrich	98,0%
Deoxicolato de Sódio	$C_{24}H_{39}NaO_4$	Fluka	98,0%
Maleato de Sódio	$C_4H_3NaO_4$	Sigma	99,0%
Di-hidrogeno Fosfato de Potássio	KH_2PO_4	Merck	99,5%
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	Panreac	98,0%
Tetraborato de Sódio	$Na_2B_4O_7.10H_2O$	Panreac	98,0%
Cloreto de Sódio	$NaCl$	Panreac	99,5%
Ácido Acético Glacial	$C_2H_4O_2$	Panreac	99,7%
Ácido Clorídrico	HCl	Riedel de Haën	37,0%

2.2. Métodos Experimentais

2.2.1. Determinação das Constantes de Ionização

As macroconstantes e as microconstantes de ionização da moxifloxacina e da sarafloxacina foram determinadas por espectrofotometria de absorção molecular (UV) à temperatura ambiente.

Soluções de fluoroquinolona de concentração aproximadamente 30,0 μ M foram preparadas em soluções com diferentes valores de pH. As soluções foram obtidas a partir de uma solução de HCl com concentração 0,001 M e uma solução de NaOH com concentração 0,001 M, misturando volumes adequados de cada uma até se obter o pH desejado. O pH foi medido com um medidor Hanna instruments HI 9321, previamente calibrado com padrões de pH 4,01 e 7,01. A força iónica das soluções foi ajustada para 0,15 M com cloreto de sódio. O espectro de absorvância de cada solução de moxifloxacina e de sarafloxacina foi traçado num intervalo de comprimento de onda de 199,0 nm a 400,0 nm, num espectrofotómetro de UV, Shimadzu 1700.

2.2.2. Determinação das Rectas de Calibração

Prepararam-se soluções tampão com diferentes valores de pH: solução tampão acetato com concentração de 0,1 M e pH igual a 3,0; solução tampão acetato com concentração de 0,2 M e pH igual a 5,0; solução tampão fosfato com concentração de 0,1 M e pH igual a 7,0; solução tampão borato com concentração de 0,025 M e pH igual a 9,0. A força iónica de cada solução foi ajustada por adição da quantidade apropriada cloreto de sódio para o valor de 0,15 M. Cada solução foi saturada em 1-octanol a $25,0 \pm 0,1$ °C, ficando em agitação num agitador orbital Stuart, modelo SSL1, durante aproximadamente 24 horas. As duas fases foram separadas com auxílio de uma ampola de decantação.

Para as rectas de calibração prepararam-se soluções, de concentração rigorosamente conhecida de fluoroquinolona em cada solução tampão saturada em 1-octanol (a massa do princípio activo foi pesada em balanças analíticas, Mettler toledo AB204 com precisão de 0,0001 g e Precisa 40 SM-200A com precisão de 0,01 mg) e traçaram-se os espectros de

absorvância no espectrofotômetro de UV. Repetiu-se o mesmo procedimento usando o 1-octanol, saturado em cada solução tampão, como solvente.

Na Tabela 2.2 estão registados os valores de comprimento de onda obtidos para o valor máximo de absorvância de cada solução.

Para a moxifloxacina a gama de pH estudada foi de 5,0 a 9,0 e para a sarafloxacina foi de 3,0 a 9,0. No entanto, para esta última fluoroquinolona não foi possível traçar rectas de calibração em 1-octanol saturado em solução tampão de pH 3,0 e 9,0, por não ter sido possível obter a completa dissolução da fluoroquinolona.

Tabela 2.2: Comprimentos de onda usados para cada fluoroquinolona.

pH		λ (nm)	
		Moxifloxacina	Sarafloxacina
3,0	Solução Tampão	---	279,5
	1-Octanol	---	---
5,0	Solução Tampão	295,0	278,0
	1-Octanol	296,0	283,0
7,0	Solução Tampão	289,5	273,5
	1-Octanol	297,0	283,0
9,0	Solução Tampão	288,0	278,0
	1-Octanol	296,0	---

Depois de seleccionado o comprimento de onda para cada solução, prepararam-se vários padrões numa gama de concentrações de 0,002 mg/mL a 0,015 mg/mL e traçaram-se as respectivas rectas de calibração da absorvância em função da concentração mássica em (mg/mL) utilizando o método dos mínimos quadrados. As rectas de calibração obtidas encontram-se no Apêndice A.

2.2.3. Determinação do Coeficiente de Partição Aparente

O coeficiente de partição aparente foi determinado pelo método da agitação à temperatura de 25,0 °C [26, 28]. Optou-se por este método pela sua simplicidade e por não haver o risco de formação de emulsões entre os solventes usados e os solutos. O

coeficiente de partição aparente foi determinado num sistema 1-octanol/solução aquosa, numa gama de pH de 3,0 a 9,0 com força iónica constante e igual a 0,15 M.

Para tal, preparou-se uma solução de concentração 0,01 mg/mL de fluoroquinolona em solução tampão (o que corresponde a uma concentração de 23,0 μM para a moxifloxacina e 26,0 μM para a sarafloxacina). Os solventes foram previamente saturados pelo procedimento descrito na secção anterior. Adicionaram-se volumes iguais (5,0 mL) de solução de antibiótico e de 1-octanol e foram sujeitos a agitação durante 24 horas no agitador orbital a 200 rpm, de forma a garantir o equilíbrio de partição. Estudos anteriores indicam que este período garante que o equilíbrio foi atingido para a maioria das fluoroquinolonas ^[28]. O agitador orbital encontrava-se num banho de ar em acrílico isolado, capaz de manter a temperatura em $25,0 \pm 0,1$ °C através de um controlador PID. Após o período de agitação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos numa centrífuga Eppendorf 5804. Para amostrar as fases usaram-se seringas, de forma a minimizar as perturbações no equilíbrio das fases. A quantificação da concentração de fluoroquinolona em ambas as fases, aquosa e orgânica, foi feita por espectrofotometria UV, ao comprimento de onda previamente estabelecido na Tabela 2.2.

2.2.4. Determinação do Coeficiente de Partição Aparente na Presença de Contra-íões

O estudo da influência do par iónico na lipofilicidade da moxifloxacina e da sarafloxacina, foi realizado aplicando o seu conceito na determinação do coeficiente de partição aparente, ou seja, foi medido o coeficiente de partição aparente de cada uma das fluoroquinolonas na presença de diversos contra-íões. O procedimento utilizado para a determinação do coeficiente de partição aparente foi o descrito na secção 2.2.3, à mesma temperatura de trabalho e na mesma gama de valores de pH. As soluções de fluoroquinolona foram preparadas com uma concentração de 0,01 mg/mL nas várias soluções tampão, tendo-se variado a razão molar entre o antibiótico e o contra-íão desde 1:1 até 1:100. O pH da solução aquosa foi verificado após adicionar-se o contra-íão, para garantir que se estava a trabalhar no valor desejado. O volume usado para cada fase em equilíbrio foi de 5,0 mL e no final ambas as fases foram analisadas por espectrofotometria de UV, ao comprimento de onda previamente estabelecido Tabela 2.2.

3. Resultados Experimentais e Discussão

3.1. Determinação das Constantes de Ionização

Tal como já foi referido, as fluoroquinolonas apresentam na sua estrutura molecular dois grupos protonados, um grupo carboxílico e um grupo da amina secundária, onde a região de acidez de ambos os grupos se sobrepõe para alguns valores de pH. Consequentemente, em solução aquosa, estas fluoroquinolonas podem encontrar-se sob a forma de quatro microespécies: espécie positiva (H_2Q^+), espécie anfotérica (HQ^\pm), espécie neutra (HQ^0) e espécie negativa (Q^-) [11, 16, 20].

Como se pode observar na Figura 3.1 e Figura 3.2, nos espectros da moxifloxacina e da sarafloxacina em soluções tampão com diferentes valores de pH existem dois máximos de absorção característicos, em bandas completamente distintas e independentes.

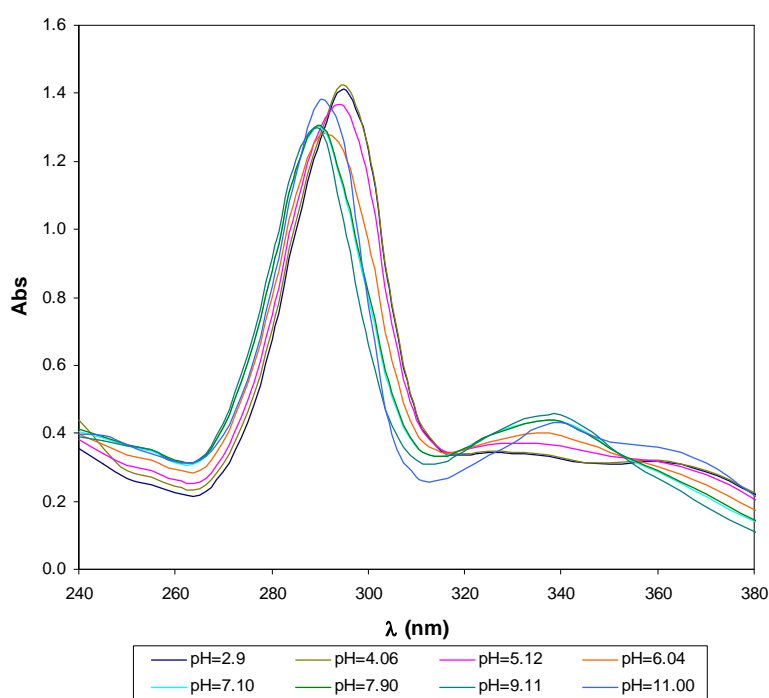


Figura 3.1: Espectros da moxifloxacina para diferentes valores de pH.

Um dos máximos é observado numa gama de comprimento de onda entre 300,0 e 380,0 nm e é característico da protonação do grupo amina, e o segundo máximo de absorção, mais intenso, é observado numa gama de comprimento de onda entre 240,0 e

300,0 nm, que caracteriza a desprotonação do grupo carboxílico. Esta última banda é dependente do valor de pH da solução, sofrendo desvios para comprimentos de onda superiores com a diminuição do pH. Desta forma, é possível determinar-se a fracção de desprotonação deste grupo a partir do espectro de absorção da fluoroquinolona em função do valor de pH [16, 23, 24, 36, 37].

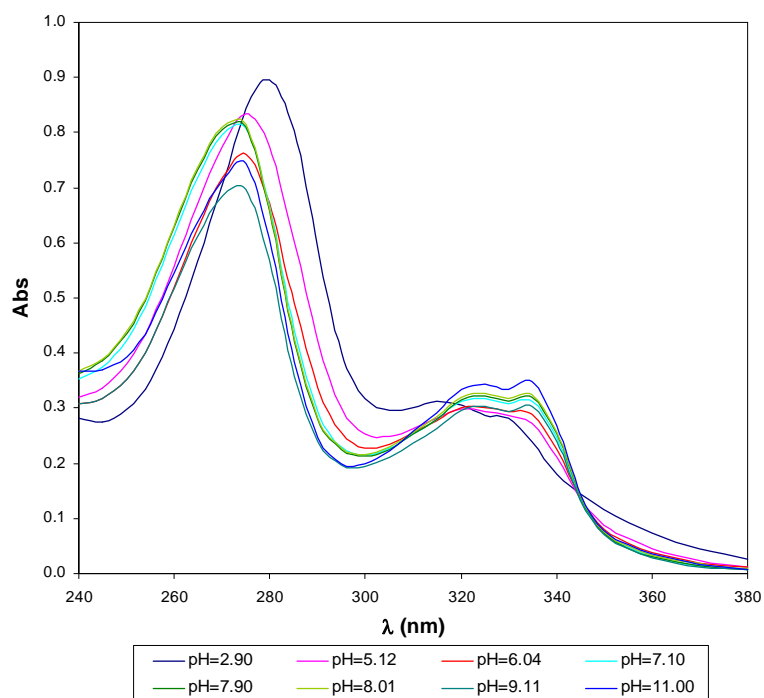


Figura 3.2: Espectros da sarafloxacina para diferentes valores de pH.

Nos espectros de ambas as fluoroquinolonas é possível detectar pontos isosbéticos. A estes comprimentos de onda a absorvância das duas espécies das fluoroquinolonas é a mesma, independentemente do pH da solução, o que significa que o coeficiente de absortividade molar (também designado por coeficiente de extinção molar) da espécie protonada e da sua base conjugada é o mesmo [23, 24, 37]. Na moxifloxacina o ponto isosbético relativo ao grupo carboxílico encontra-se a 319,4 nm e na sarafloxacina a 311,6 nm. Na gama de comprimentos de onda entre 280,0 nm e o ponto isosbético de cada fluoroquinolona verifica-se a maior diferença entre a absorvância da forma ácida e da forma básica conjugada, ou seja é onde a dependência da protonação do grupo carboxílico

com o pH é mais acentuada, sendo então possível determinar-se a fracção de desprotonação relativa a este grupo.

A fracção de desprotonação do grupo carboxílico de ambas as fluoroquinolonas pode ser calculado através das absorvâncias em função do pH da solução pela seguinte equação ^[16, 23, 24]:

$$\alpha_{\text{COO}^-}(\text{pH}) = \frac{A_{(\text{pH})} - A_{(\text{COOH})}}{A_{(\text{COO}^-)} - A_{(\text{COOH})}} \quad (3.1)$$

onde $A_{(\text{COO}^-)}$ e $A_{(\text{COOH})}$ são valores experimentais de absorvância quando o grupo carboxílico está desprotonado e protonado respectivamente e $\alpha_{(\text{COO}^-)}$ é a fracção de desprotonação do grupo carboxílico para um determinado valor de pH, para o qual a absorvância é $A_{(\text{pH})}$. Neste trabalho, os valores de $\alpha_{(\text{COO}^-)}$ para a moxifloxacina foram determinados a 300,0 nm e para a sarafloxacina foram determinados a 284,0 nm.

Baseado nos equilíbrios de protonação das fluoroquinolonas (Figura 1.3 e 1.4), a fracção de desprotonação do grupo carboxílico pode também ser definida como ^[16, 23, 24]:

$$\alpha_{\text{COO}^-}(\text{pH}) = \frac{k_{21}[\text{H}^+] + K_1K_2}{[\text{H}^+]^2 + K_1[\text{H}^+] + K_1K_2} \quad (3.2)$$

Igualando as equações (3.1) e (3.2) pode-se calcular as duas macroconstantes, K_1 , K_2 , e uma microconstante de ionização, k_{21} , por ajuste da fracção de desprotonação do grupo carboxílico, calculada com os dados experimentais das absorvâncias, em função do valor de pH, por um método iterativo, como por exemplo o de Newton-Raphson (implementado numa subrotina da função solver do excell[®]). A função objectivo a minimizar é dada pela expressão $\sum |\alpha_{\text{exp}} - \alpha_{\text{calc}}|$, onde α_{exp} é dado pela equação (3.1) e

α_{calc} é dado pela equação (3.2). Na Figura 3.3 estão representados os dados experimentais de $\alpha_{(\text{COO}^-)}(\text{pH})$ assim como, os valores obtidos pelo método iterativo.

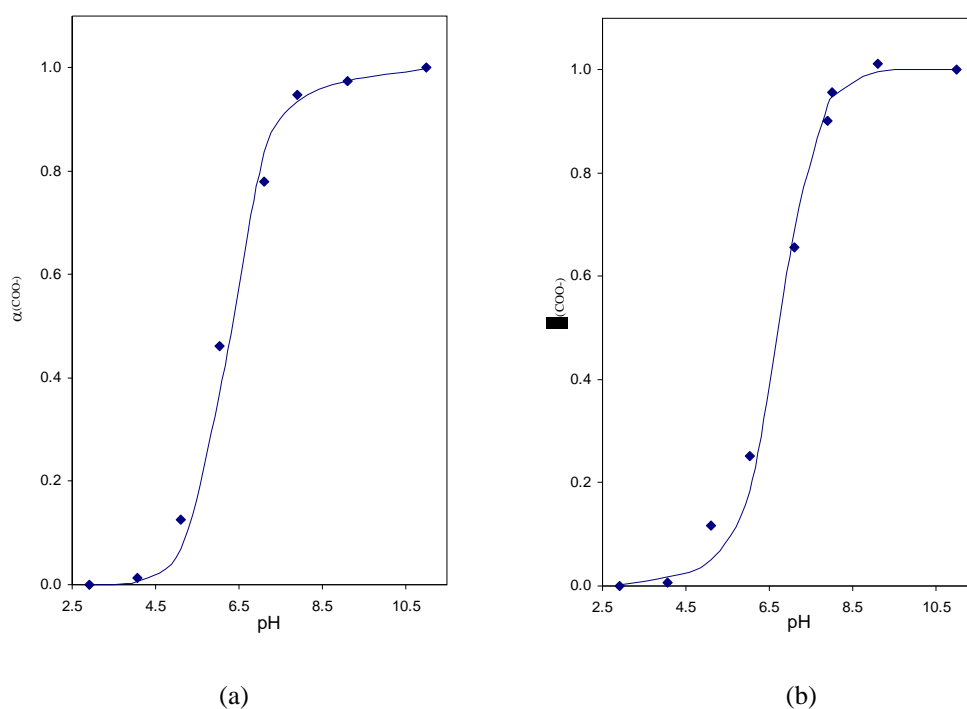


Figura 3.3: Fracção de desprotonação em função do pH. (a) moxifloxacina a 300,0 nm, (b) sarafloxacina a 284,0 nm. A linha corresponde aos $\alpha_{(\text{COO}^-)}$ calculados pelo método iterativo.

As restantes microconstantes, k_{11} , k_{12} e k_{22} foram determinadas a partir dos valores obtidos de K_1 , K_2 e k_{21} pelas equações (1.7 – 1.9) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Constantes de ionização determinadas neste trabalho.

Fluoroquinolona		Macroconstantes		Microconstantes			
		pK_1	pK_2	pk_{11}	pk_{12}	pk_{21}	pk_{22}
Moxifloxacina	este trab.	6,23	9,08	7,53	7,78	6,26	9,05
	ref. [16]	6,25	9,29	7,46	8,08	6,29	9,25
Sarafloxacina	este trab.	4,12	6,78	5,58	6,79	4,11	5,32
	ref.[17]	4,10	6,80	---	---	---	---

Os valores determinados neste trabalho para pK_1 e pK_2 para as duas fluoroquinolonas são muito semelhantes aos valores encontrados na literatura ^[16, 17]. O valor de pK_1 da moxifloxacina mostra que este composto é um ácido mais fraco do que os ácidos carboxílicos aromáticos ($pK_a \cong 5,0$)^[22]. A formação de ligações intra-moleculares, por pontes de hidrogénio, entre o grupo carboxílico não ionizado e o grupo cetona no anel de quinolina aumentam a estabilidade da forma protonada do grupo carboxílico ^[24, 38], sendo responsáveis pelas características pouco ácidas das fluoroquinolonas. O valor de pK_2 da moxifloxacina está de acordo com os valores da literatura para compostos com grupos amina secundárias ^[24].

O valor de pK_1 da sarafloxacina indica que este composto é um ácido mais forte do que a moxifloxacina e do que a generalidade das fluoroquinolonas. O valor de pK_2 da sarafloxacina quando comparado com valores da literatura para compostos com grupos amina estruturalmente semelhantes, como é o caso da ciprofloxacina ($pK_2 = 8,73$) e da grepafloxacina ($pK_2 = 8,78$) ^[24] é muito baixo. No entanto, está de acordo com valores de pK_2 da literatura para a sarafloxacina ^[17]. O facto de os valores de pK_1 e pK_2 da sarafloxacina serem inferiores ao esperado, pode estar relacionado com o efeito exercido pela electronegatividade do átomo de flúor do substituinte R_1 na estrutura deste composto ^[17].

Com base nas macroconstantes e microconstantes de ionização da sarafloxacina, a distribuição das quatro microespécies em solução aquosa, em função do valor de pH pode ser determinada através das equações (1.10-1.13), tal como foi descrito para a moxifloxacina na secção 1.2. Na Figura 3.4 está representada a distribuição de microespécies para a sarafloxacina.

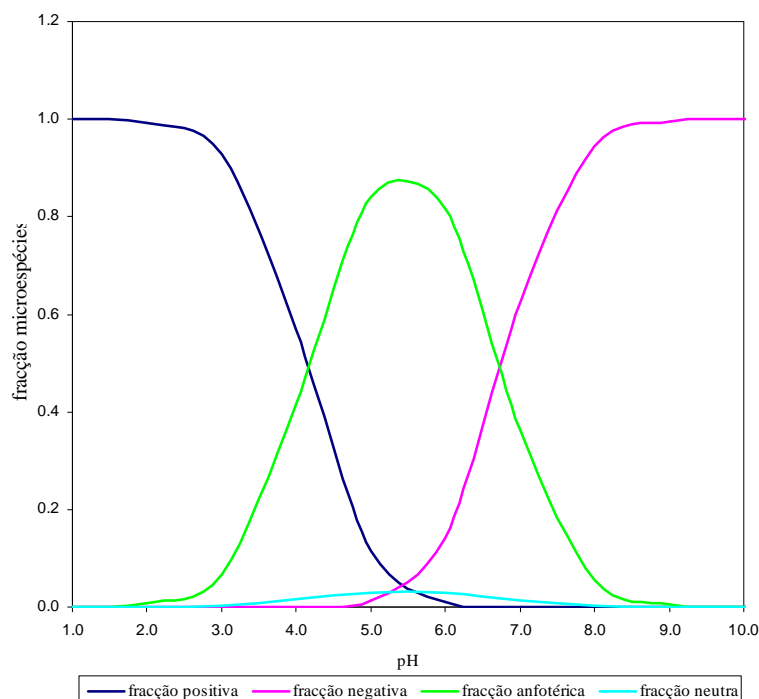


Figura 3.4: Diagrama de distribuição das microespécies de sarafloxacina.

É bem visível a predominância da forma anfotérica sobre a forma neutra em toda a gama de pH e que ambas alcançam um máximo quando o valor de pH está próximo do ponto isoelétrico, o qual foi determinado pela equação (1.14), $pI = 5,5$.

A razão entre a fração molar da forma neutra e da forma anfotérica é equivalente a k_{11}/k_{21} . Este valor é constante em toda a gama de pH (a moxifloxacina tem um valor de 5,33 % e a sarafloxacina tem o valor de 3,63 %) e é característico de cada fluoroquinolona. De acordo com Takács-Novák *et. al*^[29], apenas a espécie neutra é lipofílica, ou seja, é a única que é solúvel em compostos orgânicos. Assim, quanto maior for este quociente maior é a lipofilicidade do composto, determinando a sua capacidade para alcançar o interior de bactérias^[23, 24].

3.2. Determinação do Coeficiente de Partição

3.2.1. Coeficiente de Partição Aparente

O método experimental usado na determinação do coeficiente de partição aparente foi o método da agitação, tal como foi descrito na secção 2.2.3. A quantificação de fluoroquinolona em cada uma das fases resultantes foi feita por espectrofotometria de absorção molecular (UV). Considerou-se a equação (1.20) para a determinação do coeficiente de partição aparente, a qual pode ser definida em termos de absorvâncias pela equação (3.3):

$$P_{app} = \frac{A_i - A_f}{A_f} \times \frac{V_{aq}}{V_o} \quad (3.3)$$

onde, A_i e A_f representam, respectivamente a absorvância da fluoroquinolona na fase aquosa antes e depois de o equilíbrio ter sido atingido, V_{aq} e V_o representam, respectivamente os volumes de fase aquosa e de fase orgânica usados em cada ensaio.

Na Tabela 3.2 encontram-se os valores médios de absorvância obtidos para cada valor de pH assim como, os valores de massa de moxifloxacina na fase aquosa, antes e depois de o equilíbrio ter sido atingido, m_i e m_f respectivamente. Na mesma tabela encontram-se listados os valores de massa de moxifloxacina que passou para o 1-octanol obtidos por utilização da recta de calibração da moxifloxacina em 1-octanol, m_o . Uma vez que esta quantidade é normalmente bastante pequena, o que pode originar erros elevados na sua medição, testou-se a possibilidade de quantificar a massa de fluoroquinolona na fase de 1-octanol por utilização de um balanço de massa, (m_o^{bm}). Comparando o valor de massa de moxifloxacina que passou para o 1-octanol obtido por balanço de massa, (m_o^{bm}) com o valor obtido directamente, por utilização da recta de calibração da moxifloxacina em 1-octanol, m_o , determinaram-se os desvios correspondentes pela equação (3.4), os quais estão apresentados também na Tabela 3.2.

$$\text{Desvio\%} = \frac{|m_o^{\text{bm}} - m_o|}{m_o^{\text{bm}}} \times 100 \quad (3.4)$$

Tabela 3.2: Absorvâncias e massas de moxifloxacina a diferentes pH em ambas as fases.

pH	Fase Aquosa				Fase Orgânica			
	A _i	m _i (mg)	A _f	m _f (mg)	A _o	m _o (mg)	m _o ^{bm} (mg)	Desvio %
5,0	0,970	0,051	0,802	0,042	0,192	0,009	0,009	1,85
7,0	0,927	0,035	0,640	0,023	0,290	0,012	0,012	2,50
9,0	0,939	0,049	0,648	0,033	0,303	0,017	0,016	4,03

Da mesma forma, determinou-se através de um balanço de massa a quantidade de sarafloxacinina que passou para a fase de 1-octanol, para cada valor de pH, e comparou-se com o valor obtido directamente, pela recta de calibração da sarafloxacinina em 1-octanol. Os desvios correspondentes foram determinados pela equação (3.4), os quais estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Absorvâncias e massas de sarafloxacinina a diferentes pH em ambas as fases.

pH	Fase Aquosa				Fase Orgânica			
	A _i	m _i (mg)	A _f	m _f (mg)	A _o	m _o (mg)	m _o ^{bm} (mg)	Desvio %
3,0	0,747	0,045	0,653	0,039	---	---	0,006	---
5,0	0,798	0,047	0,653	0,039	0,116	0,008	0,009	1,87
7,0	0,702	0,050	0,622	0,045	0,086	0,006	0,005	3,20
9,0	0,686	0,051	0,650	0,048	---	---	0,003	---

Os valores dos desvios para a massa de moxifloxacina e de sarafloxacina, na fase orgânica são inferiores a 4,1 % e 3,3 %, respectivamente. Estes desvios devem-se essencialmente, a erros experimentais associados á utilização da recta de calibração pois a quantidade de fluoroquinolona é muito baixa. Assim sendo, considera-se válido o balanço de massa para a quantificação destas fluoroquinolonas na fase orgânica.

Os valores do coeficiente de partição aparente determinados pela equação (3.3) estão listados na Tabela 3.4, assim como o logaritmo dos resultados e os respectivos desvios padrão (D.P.), onde n é o número de ensaios paralelos, que se realizaram para a moxifloxacina e para a sarafloxacina.

Tabela 3.4: Coeficiente de partição aparente para a moxifloxacina e para a sarafloxacina, a diferentes pH.

pH	Moxifloxacina				Sarafloxacina			
	P_{app}	$\log(P_{app})$	D.P.	n	P_{app}	$\log(P_{app})$	D.P.	n
3,0	---	---	---	---	0,144	-0,841	0,021	6
5,0	0,217	-0,663	0,034	6	0,223	-0,652	0,020	6
7,0	0,444	-0,353	0,013	6	0,178	-0,888	0,024	6
9,0	0,433	-0,366	0,052	6	0,055	-1,261	0,001	6

Na Figura 3.5 e na Figura 3.6 estão representados os valores do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina e da sarafloxacina, respectivamente, num sistema 1-octanol/solução tampão, para os diferentes valores de pH.

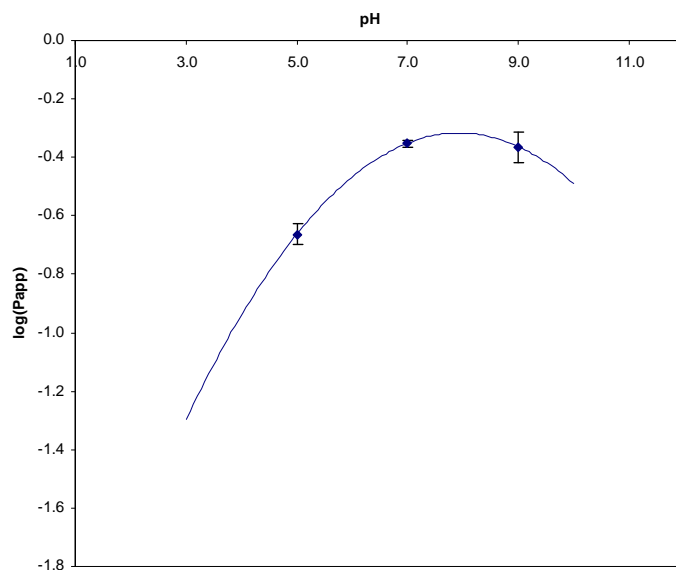


Figura 3.5: Perfil de partição aparente da moxifloxacina em função do pH.

Verifica-se que a distribuição dos valores do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina em função dos valores de pH apresenta um perfil parabólico como se pode observar pela linha de tendência representada, sendo o máximo de lipofilicidade atingido para valores de pH próximos de 8,0, coincidindo com o ponto isoelético da moxifloxacina determinado através da equação (1.14), $pI = 7,8$.

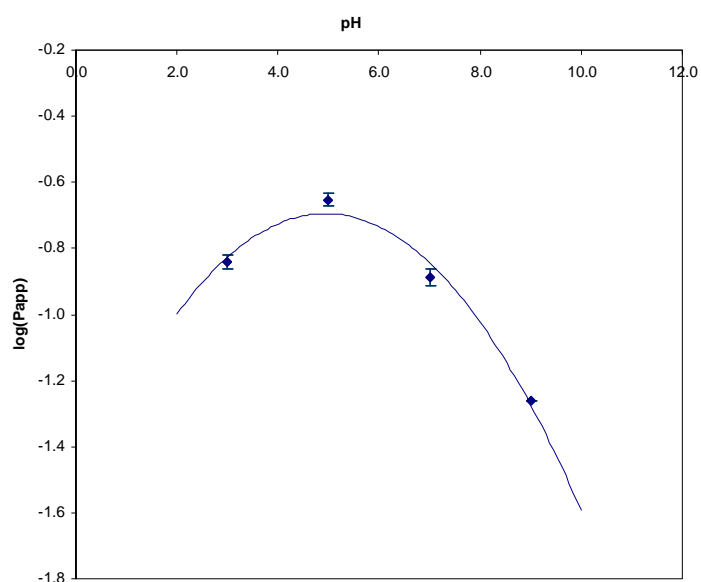


Figura 3.6: Perfil de partição aparente da sarafloxacina em função do pH.

As mesmas conclusões podem ser obtidas por análise dos valores do coeficiente de partição aparente da sarafloxacinina em função do pH. O máximo de lipofilicidade para este composto é mais uma vez coincidente com o valor do seu ponto isoelétrico, $pI = 5,5$.

Para compostos anfotéricos como as fluoroquinolonas é esperado que a distribuição do coeficiente de partição aparente em função do pH tenha a forma parabólica, ou seja segue uma distribuição de Gauss ^[16, 28]. As espécies com menor carga são as mais lipofílicas e são aquelas que predominam no ponto isoelétrico de cada composto. Por outro lado, à medida que o valor de pH se afasta do ponto isoelétrico a fracção de espécies carregadas aumenta, as quais são menos lipofílicas, o que provoca uma diminuição do coeficiente de partição aparente.

3.2.2 Coeficiente de Partição Verdadeiro

O coeficiente de partição verdadeiro foi definido com base no coeficiente de partição aparente e na concentração relativa de espécie neutra em solução, tal como descreve a equação (1.22).

Para o valor de pH igual ao pH do ponto isoelétrico de cada fluoroquinolona, a fracção de espécie neutra em solução aquosa é máxima. Nestas condições o composto pode ser considerado neutro^[26] e o coeficiente de partição verdadeiro (K_{ow}) pode ser determinado. Para a moxifloxacinina e sarafloxacinina o valor do coeficiente de partição verdadeiro no sistema 1-octanol/solução aquosa, determinado a partir da equação (1.23) é $\log(K_{ow}) = 1,01$ e $\log(K_{ow}) = 0,864$, respectivamente, podendo-se concluir que a moxifloxacinina é um composto mais lipofílico do que a sarafloxacinina.

Conhecendo o valor do coeficiente de partição verdadeiro de cada fluoroquinolona e a concentração relativa da espécie neutra em função do pH, é possível prever a distribuição de partição aparente para toda a gama de valores de pH através da equação (1.22).

Na Figura 3.7 e Figura 3.8 estão representadas as previsões do coeficiente de partição aparente em função do pH calculadas a partir da equação (1.22) para a moxifloxacinina e sarafloxacinina, respectivamente. Observa-se para ambas as fluoroquinolonas, uma excelente concordância com os dados experimentais no pH

correspondente ao ponto isoelétrico, embora à medida que o pH se afasta deste valor se obtenham desvios elevados entre os dados experimentais e as previsões calculadas pela equação (1.22), quer para pH ácidos, quer para pH básicos. Os valores obtidos experimentalmente em meio ácido são muito superiores aos previstos, o que indica uma solubilidade da forma neutra superior ao previsto. Este comportamento pode ser explicado através da formação de pares iónicos, entre o grupo amina secundária presente em ambas as fluoroquinolonas e os aniões da solução tampão, formando assim, espécies neutras mais lipofílicas, aumentando o coeficiente de partição aparente. Estudos anteriores evidenciaram que fluoroquinolonas com grupos amina secundária formam facilmente pares iónicos ^[28].

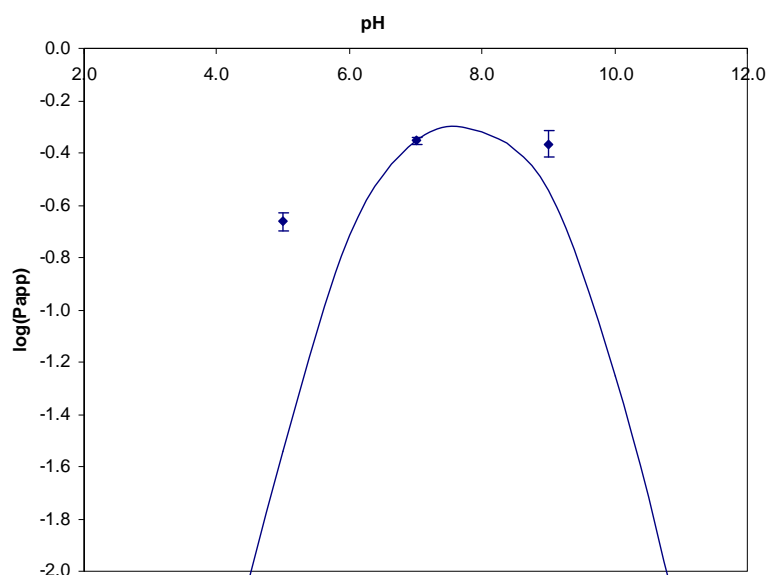


Figura 3.7: Distribuição de partição em função do pH, para a moxifloxacina. A linha representa a previsão de $\log(P_{app})$.

Em meio básico também se obtêm valores superiores aos esperados, principalmente para a sarafloxacina a $\text{pH} = 9,0$. A razão para estes valores não é muito clara, podendo ser devida à formação de pares iónicos entre as espécies negativas da fluoroquinolona e os catiões presentes nas soluções tampão.

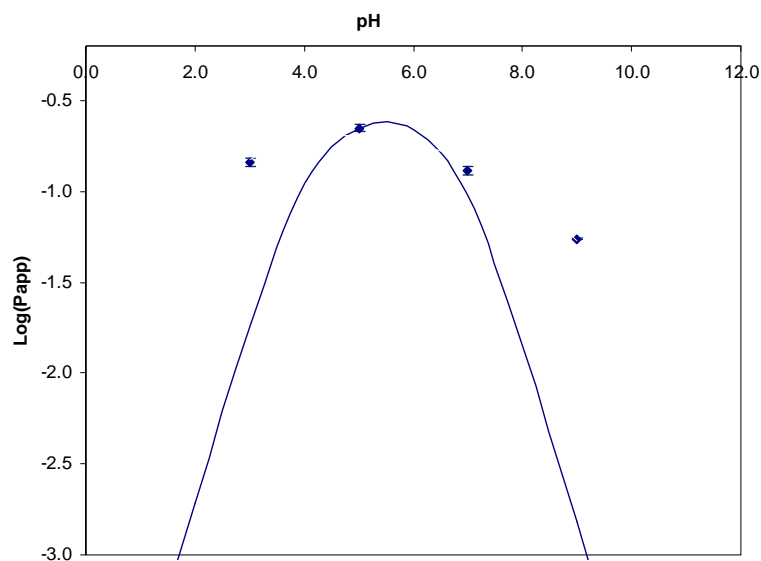


Figura 3.8: Distribuição de partição em função do pH, para a sarafloxacina. A linha representa a previsão de $\log(P_{app})$.

A mesma conclusão pode ser obtida por análise da equação (1.22), onde se verifica que no cálculo de P_{app} a partir de K_{ow} é apenas considerada a fracção de espécie neutra, HQ^0 , não tendo em conta a possível formação de pares iónicos.

3.3. Coeficiente de Partição Aparente na Presença de Contra-íões

A influência da formação de pares iónicos na lipofilicidade das fluoroquinolonas foi estudada neste trabalho usando quatro contra-íões na determinação do coeficiente de partição aparente no sistema 1-octanol/solução aquosa, para a gama de valores de pH estudada anteriormente.

Com a moxifloxacina foram estudados três contra-íões, nomeadamente o ião acetato (Ac), o ião mesilato (Mes) e o ião deoxicolato (Doc). Este último só foi possível testar para pH igual a 7,0. O ião deoxicolato pertence a um grupo de biosurfactantes que se designam por sais da bÍlis. Em soluções aquosas estes sais formam emulsões muito facilmente sendo necessário garantir que a determinação do coeficiente de partição aparente é efectuada a concentrações inferiores à concentração micelar crítica do contra-

ião. A literatura indica que este tensioactivo apresenta uma gama de valores de concentração micelar crítica, formando micelas de estruturas diversas de acordo com as diferentes concentrações ^[39]. A concentração mínima à qual ocorre a formação de micelas está descrita na literatura como sendo igual a 2,4 mM em água ^[39], tendo-se verificado que esta concentração depende fortemente da presença de iões sódio em solução.

No caso da sarafloxacinina foram estudados quatro contra-íões, os três anteriormente descritos e ainda o ião hidrogenomaleato (Hmal). Este composto é um ácido diprótico com constantes de ionização da ordem de $pK_{a1} = 2,78$ e $pK_{a2} = 4,05$ ^[35], limitando o seu uso ao pH igual a 3 de forma a garantir que o ácido se encontra na forma de mono anião.

Na Tabela 3.5 e Tabela 3.6 estão registados os valores do coeficiente de partição aparente e os respectivos desvios padrão, da moxifloxacinina e sarafloxacinina respectivamente, na ausência (branco) e na presença dos vários contra-íões, para a gama de valores de pH estudada. Estes valores correspondem aos valores de coeficiente de partição aparente mais elevados obtidos através da utilização de diferentes concentrações dos diferentes contra-íões e n é o número de ensaios paralelos, que se realizaram para a moxifloxacinina e para a sarafloxacinina.

Tabela 3.5: Valores de P_{app} e respectivos desvio-padrão (D.P.) da moxifloxacinina, na ausência e na presença de contra-íões.

pH	$P_{app} (\pm D.P.)$				n
	Branco	Acetato	Mesilato	Deoxicolato	
5,0	0,217 (0,034)	0,309 (0,017)	0,276 (0,021)	---	6
7,0	0,444 (0,013)	0,572 (0,009)	0,512 (0,055)	0,579 (0,007)	6
9,0	0,433 (0,052)	0,386 (0,004)	0,371 (0,007)	---	6

Tabela 3.6: Valores de P_{app} e respectivos desvio-padrão (D.P.) da sarafloxacinina, na ausência e na presença de contra-íões.

pH	$P_{app} (\pm D.P.)$					n
	Branco	Acetato	Mesilato	Deoxicolato	Hidrogenomaleato	
3,0	0,144 (0,021)	0,295 (0,008)	0,250(0,015)	---	0,286 (0,019)	6
5,0	0,223 (0,020)	0,246 (0,014)	0,282(0,014)	---	---	6
7,0	0,178 (0,024)	0,171 (0,010)	0,246(0,012)	0,272(0,025)	---	6

A partição dos pares iônicos formados com a moxifloxacina e a sarafloxacina em função do pH está representada nas Figura 3.9 e Figura 3.10, respectivamente. A partição das fluoroquinolonas na ausência de contra-íão, designada por branco, também se encontra representada para facilitar a percepção do efeito produzido por cada contra-íão.

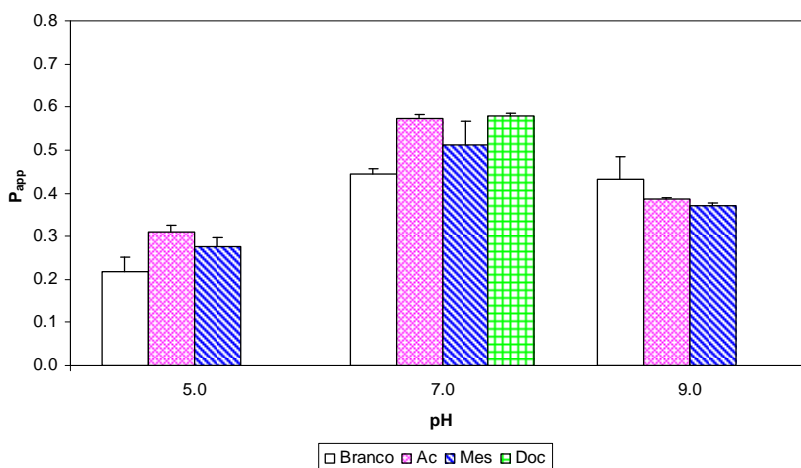


Figura 3.9: Influência dos contra-íões no P_{app} da moxifloxacina em função do pH.

Verifica-se um aumento do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina para valores de pH iguais a 5,0 e 7,0. Os contra-íões que produzem maior efeito na lipofilicidade desta fluoroquinolona são o íão acetato e o íão deoxicolato, os quais são íões mais lipofílicos e com estruturas moleculares mais flexíveis quando comparados com o íão mesilato, como foi visto anteriormente na secção 1.4. Para o pH igual a 5,0 o aumento do coeficiente de partição aparente na presença de contra-íões foi de 1,4 vezes o valor do coeficiente de partição aparente do branco, enquanto que para o pH igual a 7,0 o aumento foi de 1,3 vezes. Estes valores são muito semelhantes, esperando-se um aumento mais significativo do coeficiente de partição aparente para pH igual a 5,0. Em solução aquosa a espécie predominante de moxifloxacina a este valor de pH é a catiónica ($f [H_2Q^+] = 0,95$), como pode ser observado na Figura 1.5, favorecendo a formação de pares iônicos e consequentemente, um aumento da sua partição na fase orgânica. Uma possível explicação é a provável formação de pares iônicos entre a fluoroquinolona e os aniões da solução tampão, aumentando o coeficiente de partição aparente quer no branco, quer nas soluções com contra-íões, como foi descrito na secção 3.2.2. O mesmo efeito pode ocorrer a pH igual a 7,0, mas como os aniões da solução tampão não são os mesmos da solução tampão

do pH igual a 5,0 o efeito que eles têm no coeficiente de partição aparente pode ser diferente. Desta forma, pode-se afirmar que se verifica praticamente o mesmo aumento do coeficiente de partição aparente na presença dos contra-íões em estudo, mesmo quando a concentração relativa de espécie catiónica de fluoroquinolona é inferior ($f [H_2Q^+] = 0,15$).

Para o pH igual a 9,0 o coeficiente de partição aparente diminui na presença dos contra-íões em estudo, não sendo claro o que acontece a nível molecular nestas condições.

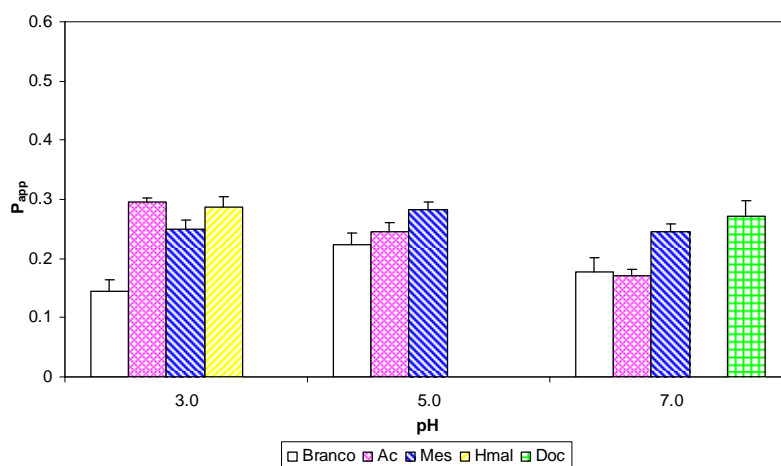


Figura 3.10: Influência dos contra-íões no P_{app} da sarafloxacina em função do pH.

Para a sarafloxacina o aumento mais significativo da lipofilicidade verifica-se a pH igual a 3,0, como seria de esperar. Para este valor de pH a concentração relativa da forma catiónica da fluoroquinolona é predominante ($f [H_2Q^+] = 0,93$), tendo em consideração o diagrama de distribuição das microespécies da sarafloxacina (Figura 3.4) e obteve-se um aumento efectivo do coeficiente de partição aparente na presença de contra íões de 2,0 vezes. Os contra-íões que mais contribuem para o aumento de lipofilicidade da sarafloxacina a pH igual a 3,0 são o ião acetato e o ião hidrogenomaleato, o que está de acordo com as suas características lipofílicas e de flexibilidade.

Para o pH igual a 5,0, a concentração relativa da espécie catiónica é inferior relativamente ao pH anterior ($f [H_2Q^+] = 0,12$). Assim, o efeito dos contra-íões na lipofilicidade da sarafloxacina é menos significativo, tendo-se verificado um aumento do coeficiente de partição aparente na presença de contra-íões de 1,3 vezes. Para o pH igual a 5,0 o contra-íão com maior contribuição para o aumento da lipofilicidade é o ião mesilato,

ao contrário do que se tinha verificado, para outros valores de pH e para a outra fluoroquinolona.

Para pH igual a 7,0 verifica-se um aumento do coeficiente de partição aparente da sarafloxacina de 1,5 vezes o coeficiente de partição aparente do branco, apesar da concentração de espécie catiónica de fluoroquinolona ser muito baixa ($f [H_2Q^+] = 4,9 \times 10^{-4}$), como se pode observar na Figura 3.4. Embora na presença do contra-ião acetato não se observe um aumento da lipofilicidade, com os contra-íões mesilato e deoxicolato verifica-se um aumento significativo. A justificação para este efeito no coeficiente de partição aparente a pH igual a 7,0, não é muito clara. O facto de os íões mesilato serem muito usados em reacções de substituição nucleofílica, pois os íões sulfónicos são bases fracas^[40], pode ser uma possível explicação. Para o valor de pH igual a 7,0, a concentração relativa de espécie negativa da sarafloxacina é predominante ($f [Q^-] = 0,62$), sendo possível que se comporte como um nucleófilo, uma vez que o grupo carboxílico da sarafloxacina tem características mais ácidas do que a maioria das fluoroquinolonas, como foi visto anteriormente. Desta forma, se o grupo carboxílico da sarafloxacina reagir com o ião mesilato forma-se uma espécie neutra mais lipofílica. O mesmo comportamento pode ocorrer com pH igual a 5,0, justificando o aumento do efeito do ião mesilato na lipofilicidade da sarafloxacina. Este efeito só se verifica quando o contra-ião mesilato se encontra em excesso relativamente à sarafloxacina numa razão molar de 1:50, em ambos os valores de pH. Relativamente ao ião deoxicolato, este ião tem uma estrutura molecular bastante complexa e seriam necessários estudos complementares para perceber o seu efeito na lipofilicidade da sarafloxacina a pH igual a 7,0.

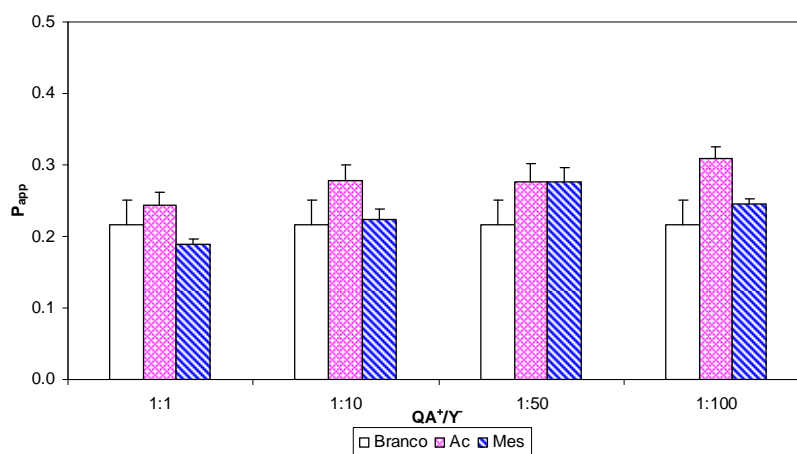
Como foi anteriormente mencionado, para cada valor de pH foi estudado a influência da concentração relativa de cada contra-ião na lipofilicidade das fluoroquinolonas. Foram usadas quatro razões molares diferentes entre a fluoroquinolona e o contra-ião (QA^+/Y^-), na determinação do coeficiente de partição aparente. Com o ião deoxicolato não foi possível testar a razão molar de 1:100, devido à formação de micelas nas soluções. Neste estudo não se considerou o pH igual a 9,0, pois a influência na lipofilicidade da moxifloxacina foi nula.

Na Tabela 3.7 encontram-se listados os valores médios do coeficiente de partição aparente e os respectivos desvios padrão ($n=6$) das duas fluoroquinolonas para as diferentes razões molares, e para cada valor de pH.

Tabela 3.7: Valores de P_{app} na presença de contra-íões, para a moxifloxacina e sarafloxacina.

P _{app} (± D.P)						
Composto	pH	Contra-íão/QA ⁺ /Y ⁻	1:1	1:10	1:50	1:100
Moxifloxacina	5,0	Acetato	0,243 (0,018)	0,279 (0,021)	0,276 (0,026)	0,309 (0,017)
		Mesilato	0,190 (0,007)	0,224 (0,015)	0,276 (0,021)	0,246 (0,007)
	7,0	Acetato	0,546 (0,002)	0,572 (0,009)	0,474 (0,051)	0,482 (0,037)
		Mesilato	0,390 (0,022)	0,512 (0,055)	0,505 (0,011)	0,437 (0,017)
		Deoxicolato	0,466 (0,013)	0,579 (0,007)	0,549 (0,003)	---
Sarafloxacina	3,0	Acetato	0,252 (0,022)	0,294 (0,012)	0,295 (0,008)	0,274 (0,028)
		Mesilato	0,130 (0,027)	0,165 (0,018)	0,250 (0,015)	0,203 (0,046)
		Hidrogenomaleato	0,181 (0,014)	0,238 (0,010)	0,286 (0,019)	0,196 (0,005)
	5,0	Acetato	0,246 (0,014)	0,204 (0,010)	0,228 (0,007)	0,232 (0,009)
		Mesilato	0,214 (0,005)	0,269 (0,013)	0,282 (0,014)	0,235 (0,017)
	7,0	Acetato	0,165 (0,007)	0,160 (0,009)	0,171 (0,010)	0,148 (0,015)
		Mesilato	0,121 (0,008)	0,189 (0,012)	0,246 (0,012)	0,203 (0,015)
		Deoxicolato	0,272 (0,025)	0,253 (0,009)	0,184 (0,020)	---

Nas Figura 3.11 e Figura 3.12 estão representados os valores do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina em função da razão molar de contra-íão, para os valores de pH igual a 5,0 e 7,0, respectivamente. Os valores do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina variam de forma diferente com o aumento da razão molar de cada contra-íão. Por outro lado, cada contra-íão tem um comportamento distinto dependendo do pH em estudo.

**Figura 3.11:** Efeito da razão molar no P_{app} da moxifloxacina, pH = 5,0.

Assim, para o valor de pH igual a 5,0 observa-se que o aumento da concentração do ião acetato produz um aumento gradual do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina, enquanto que com o ião mesilato o coeficiente de partição aparente atinge um valor máximo para a razão molar 1:50, a partir do qual o valor de P_{app} diminui.

Para o valor de pH igual a 7,0 os três contra-íons usados produzem o mesmo efeito no valor do coeficiente de partição aparente da moxifloxacina. Verificando-se um valor máximo da lipofilicidade com uma razão molar de 1:10.

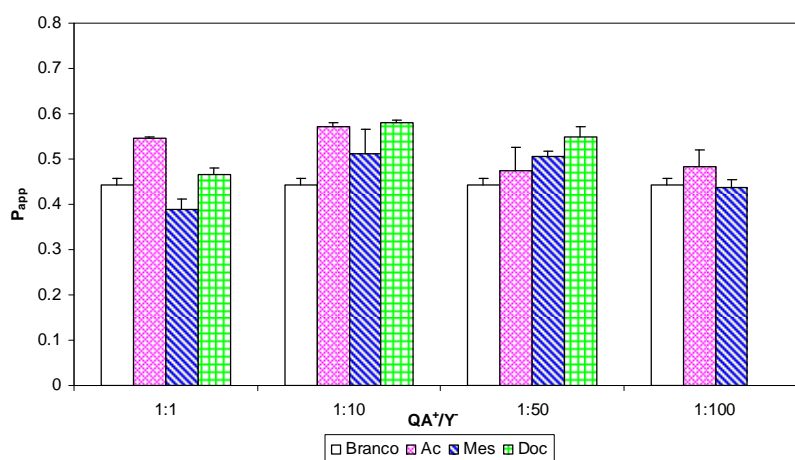


Figura 3.12: Efeito da razão molar no P_{app} da moxifloxacina, pH = 7,0.

Da Figura 3.13 à Figura 3.15 estão representados os valores do coeficiente de partição aparente da sarafloxacina em função da razão molar de contra-íon, para os valores de pH iguais a 3,0, 5,0 e 7,0, respectivamente.

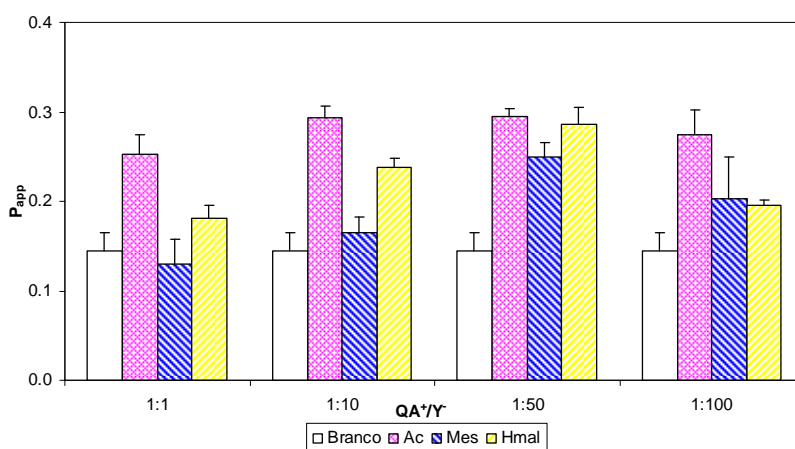


Figura 3.13: Efeito da razão molar no P_{app} da sarafloxacina, pH = 3,0.

Para o valor de pH igual a 3,0, o aumento de concentração do ião acetato aumenta o coeficiente de partição aparente da sarafloxacinina até à razão molar 1:10, mantendo-se praticamente constante a partir dessa razão molar. Os iões mesilato e hidrogenomaleato produzem ambos uma lipofilicidade máxima da sarafloxacinina para a razão molar de 1:50.

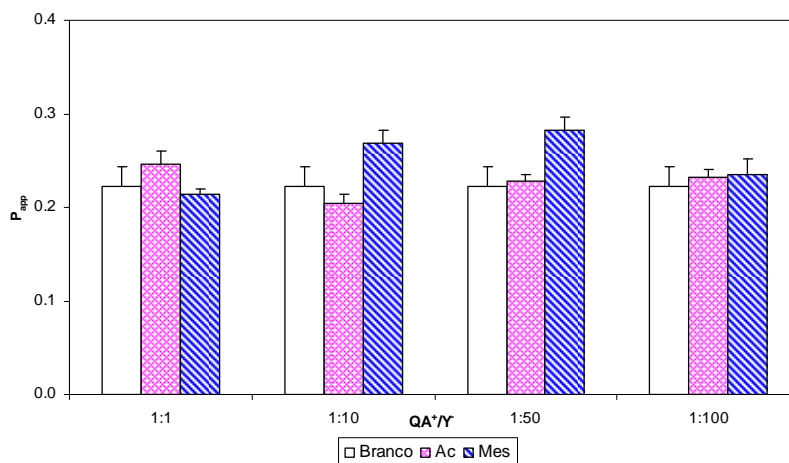


Figura 3.14: Efeito da razão molar no P_{app} da sarafloxacinina, pH = 5,0.

Para o valor de pH igual a 5,0 o ião acetato produz um aumento máximo na lipofilicidade da sarafloxacinina quando a razão molar é de 1:1, verificando-se com as restantes razões molares um efeito praticamente nulo. Com o ião mesilato, a lipofilicidade máxima da sarafloxacinina foi atingida para uma razão molar de 1:50, diminuindo ligeiramente para a razão de 1:100.

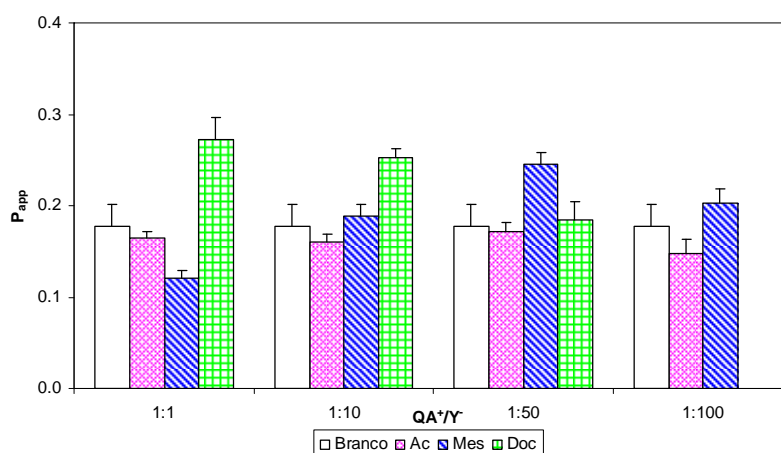


Figura 3.15: Efeito da razão molar no P_{app} da sarafloxacinina, pH = 7,0.

Para o pH igual a 7,0, o efeito do ião acetato é nulo na lipofilicidade da sarafloxacin, mantendo-se constante para toda a gama de razões molares estudada. A lipofilicidade da sarafloxacin é máxima quando a razão molar com o ião mesilato é de 1:50, enquanto que na presença do ião deoxicolato é máxima quando a razão molar é de 1:1, verificando-se uma diminuição gradual com o aumento de concentração deste contra-ião.

Deste estudo, pode-se concluir que a manipulação efectiva da lipofilicidade das fluoroquinolonas pode ser obtida por aplicação do conceito de par iónico, ou seja, por adição de contra-íões adequados. É também notório o enorme desafio que se coloca quando é necessário escolher o contra-ião que melhor se adapta às condições pretendidas, para a fluoroquinolona em questão. Verificou-se o aumento de lipofilicidade de ambas as fluoroquinolonas na presença de vários contra-íões com características muito diferentes. No entanto, esse aumento pode ser mais significativo para diferentes contra-íões, dependendo do pH do meio ou da concentração de contra-ião. Com base neste estudo pode-se concluir que o ião acetato é o contra-ião que promove uma maior lipofilicidade da moxifloxacin, na gama de pH estudada. Para a sarafloxacin não é possível seleccionar apenas um contra-ião para toda a gama de pH estudada, uma vez que o efeito que cada um produz na lipofilicidade depende fortemente do pH do meio. Assim para pH igual a 3,0 o ião acetato é o mais eficaz no aumento da lipofilicidade com uma razão molar de 1:100 para pH igual a 5,0 o melhor contra-ião é o mesilato com uma razão molar de 1:50, enquanto que para pH igual a 7,0, o melhor contra-ião é o deoxicolato com a razão molar de 1:1.

4. Conclusões

4.1. Conclusões e Notas Finais

Dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que as fluoroquinolonas são compostos anfotéricos com equilíbrios de protonação complexos que diferem consideravelmente, de acordo com a estrutura molecular de cada composto. Em solução aquosa podem existir sob a forma de quatro microespécies: espécie positiva (H_2Q^+), espécie anfotérica (HQ^\pm), espécie neutra (HQ^0) e espécie negativa (Q^-), cujas concentrações relativas dependem fortemente com pH do meio.

Pela determinação das macroconstantes de ionização de cada fluoroquinolona, K_1 e K_2 , conclui-se que a sarafloxacinina tem características mais ácidas do que a moxifloxacinina o que pode estar relacionado com o efeito exercido pela electronegatividade do átomo de flúor do substituinte R_1 na estrutura deste composto ^[17]. Da distribuição das quatro microespécies em solução aquosa de cada fluoroquinolona, em função do valor de pH verifica-se que existe predominância das espécies neutra e anfotérica para valores de pH próximos do ponto isoeléctrico de cada fluoroquinolona, para a moxifloxacinina $pI = 7,8$ e para a sarafloxacinina $pI = 5,5$.

A lipofilicidade da moxifloxacinina e da sarafloxacinina foi quantificada pela determinação do coeficiente de partição num sistema 1-octanol/solução aquosa para uma gama de valores de pH de 3,0 a 9,0. Para cada fluoroquinolona em estudo verifica-se que a distribuição do coeficiente de partição aparente em função do pH apresenta um perfil parabólico com o máximo de lipofilicidade para valores de pH próximos do ponto isoeléctrico. Para a moxifloxacinina a pH igual a 7,0 obteve-se um valor máximo de $\log(P_{app}) = -0,353$ e para a sarafloxacinina a pH igual a 5,0 obteve-se um valor máximo de $\log(P_{app}) = -0,652$. O coeficiente de partição verdadeiro foi determinado para cada fluoroquinolona considerando que o composto é neutro na proximidade do seu ponto isoeléctrico tendo-se obtido um valor de $\log(K_{ow}) = 1,01$ para a moxifloxacinina e um valor de $\log(K_{ow}) = 0,864$ para a sarafloxacinina. Assim, conclui-se que a moxifloxacinina é um composto mais lipofílico do que a sarafloxacinina sendo portanto, mais apto para penetrar em membranas celulares.

Do estudo da influência do par iónico nos coeficientes de partição de ambas as fluoroquinolonas conclui-se que é possível aumentar a lipofilicidade das fluoroquinolonas na presença de contra-íões adequados às condições pretendidas. Desta forma, obteve-se

um aumento máximo do coeficiente de partição aparente da moxifloxacin na presença de contra-íões de 1,4 vezes o coeficiente de partição aparente da moxifloxacin na ausência de contra-íões a pH igual a 5,0. Para a sarafloxacin o aumento máximo obtido foi de 2,0 vezes a pH igual a 3,0. Dos contra-íões em estudo o ião acetato revelou-se como o que melhor promove a lipofilicidade da moxifloxacin, na gama de pH estudada, com a sarafloxacin, o efeito produzido pelos contra-íões depende muito do pH do meio e da sua concentração relativa. Assim, para pH igual a 3,0 o ião acetato é o mais eficaz no aumento da lipofilicidade com uma razão molar de 1:100, para pH igual a 5,0 o melhor contra-íão é o mesilato com uma razão molar de 1:50, enquanto que para pH igual a 7,0, o melhor contra-íão é o deoxicolato com a razão molar de 1:1.

O conceito de par iónico aplicado a compostos anfotéricos e hidrofílicos como as fluoroquinolonas permite aumentar a sua afinidade com os meios orgânicos que constituem as membranas biológicas dos tecidos vivos. Desta forma, é possível melhorar propriedades farmacocinéticas das fluoroquinolonas como por exemplo a absorção ao nível das membranas celulares e a sua distribuição pelos tecidos e plasma, conduzindo a uma diminuição das doses necessárias destes fármacos.

4.2. Trabalho Futuro

Tal como foi evidenciado ao longo deste trabalho, a determinação experimental de propriedades termodinâmicas de outras fluoroquinolonas reveste-se de especial importância, uma vez que múltiplos substituintes contendo heteroátomos como N, P, O, S e F ou Cl, lhes confere uma elevada polarizabilidade e a capacidade de formar uma variedade de interações específicas com solventes polares. Por outro lado, os dados existentes na literatura são muito escassos ou mesmo inexistentes, o que limita mesmo a detecção e compreensão de tendências ao nível das propriedades físico-químicas e termodinâmicas. Os novos dados experimentais a obter poderão ser muito úteis no desenvolvimento de modelos QSAR, ou seja, correlações quantitativas entre a estrutura molecular e a actividade biológica. Com modelos matemáticos deste tipo, a potência global de uma fluoroquinolona em função da sua estrutura molecular poderá ser mais facilmente avaliada, facilitando o desenvolvimento de novos compostos.

Da mesma forma, é importante que o efeito de par iónico seja estudado com outras fluoroquinolonas de forma a estabelecer relações entre as suas estruturas moleculares e os efeitos produzidos pelos diferentes contra-íões na lipofilicidade destes compostos. Mais uma vez, estes dados experimentais serão vitais para a descrição do efeito do contra-ião e portanto no desenvolvimento de modelos matemáticos do tipo QSAR.

O trabalho realizado evidenciou também a importância da compreensão de alguns dos efeitos produzidos pelos contra-íões ao nível molecular, nomeadamente porque é que a lipofilicidade da sarafloxacina aumenta quando está na presença dos contra-íões mesilato e deoxicolato a pH 7,0, apesar de não existir espécie catiónica da sarafloxacina. Técnicas como por exemplo, a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectroscopia no infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR) poderiam ser utilizadas nesse sentido.

A determinação do coeficiente de partição das fluoroquinolonas na presença de contra-íões noutros sistemas, como por exemplo sistemas de lipossomas/solução aquosa podem contribuir para uma melhor caracterização e quantificação da lipofilicidade destes compostos. Actualmente existem estudos da lipofilicidade de diversas fluoroquinolonas, nomeadamente ciprofloxacina e grepafloxacina, em sistemas de lipossomas/solução aquosa, mas nenhum realizado na presença de contra-íões.

Como nota final, sugere-se ainda o desenvolvimento de novos compostos com actividade biológica baseados em líquidos iónicos usando as fluoroquinolonas como princípio activo farmacêutico. A maior parte dos princípios activos sólidos apresenta o problema da existência de polimorfos, que são compostos com a mesma forma molecular mas estrutura cristalina diferente, e portanto actividade biológica distinta. A obtenção de um princípio activo no estado líquido poderá solucionar esta questão.

5. Apêndices

Apêndice A – Rectas de calibração

As rectas de calibração e os respectivos valores do coeficiente de correlação múltiplo (r^2) estão apresentadas na Tabela 5.1 e Tabela 5.2, para a moxifloxacina e a sarafloxacina, respectivamente.

Tabela 5.1: Rectas de calibração e respectivos valores do coeficiente de correlação para moxifloxacina.

pH		Moxifloxacina	
5,0	Solução Tampão	$Abs = 96,32 \times C(mg/mL) - 5,49 \times 10^{-3}$	$r^2 = 0.9999$
	1-Octanol	$Abs = 94,86 \times C(mg/mL) + 2,45 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9999$
7,0	Solução Tampão	$Abs = 92,69 \times C(mg/mL) - 1,93 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9998$
	1-Octanol	$Abs = 91,33 \times C(mg/mL) + 6,53 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9998$
9,0	Solução Tampão	$Abs = 94,26 \times C(mg/mL) + 1,49 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9999$
	1-Octanol	$Abs = 93,18 \times C(mg/mL) - 1,11 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9993$

Tabela 5.2: Rectas de calibração e respectivos valores do coeficiente de correlação para sarafloxacina.

pH		Sarafloxacina	
3,0	Solução Tampão	$Abs = 83,53 \times C(mg/mL) + 6,28 \times 10^{-3}$	$r^2 = 0.9999$
	1-Octanol	---	---
5,0	Solução Tampão	$Abs = 85,51 \times C(mg/mL) - 6,40 \times 10^{-3}$	$r^2 = 0.9999$
	1-Octanol	$Abs = 56,91 \times C(mg/mL) + 2,80 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9990$
7,0	Solução Tampão	$Abs = 70,76 \times C(mg/mL) - 2,08 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9998$
	1-Octanol	$Abs = 58,72 \times C(mg/mL) + 1,63 \times 10^{-2}$	$r^2 = 0.9995$
9,0	Solução Tampão	$Abs = 67,52 \times C(mg/mL) - 3,69 \times 10^{-3}$	$r^2 = 0.9999$
	1-Octanol	---	---

6. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Domagala, J. M.; *Structure-Activity and Structure-Side-Effect Relationships for the Quinolone Antibacterials*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1994. **33**(4): p. 685-706.
2. Leshner, G. Y., Gruett, M. D., Froelich, E. J., Brundage, R. P., and Bailey, J. H.; *1,8-Naphthyridine Derivatives - a New Class of Chemotherapeutic Agents*. Journal of Medicinal & Pharmaceutical Chemistry, 1962. **5**(5): p. 1063-1065.
3. Bakken, J. S.; *The fluoroquinolones: How long will their utility last?* Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2004. **36**(2): p. 85-92.
4. Appelbaum, P. C. and Hunter, P. A.; *The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. **16**(1): p. 5-15.
5. Martinez, M., McDermott, P., and Walker, R.; *Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals*. Veterinary Journal, 2006. **172**(1): p. 10-28.
6. Domagala, J. M., Hanna, L. D., Heifetz, C. L., Hutt, M. P., Mich, T. F., Sanchez, J. P., and Solomon, M.; *New Structure-Activity-Relationships of the Quinolone Antibacterials Using the Target Enzyme - the Development and Application of a DNA Gyrase Assay*. Journal of Medicinal Chemistry, 1986. **29**(3): p. 394-404.
7. Neuman, M.; *Clinical Pharmacokinetics of the Newer Antibacterial 4-Quinolones*. Clinical Pharmacokinetics, 1988. **14**(2): p. 96-121.
8. Van Bambeke, F., Michot, J. M., Van Eldere, J., and Tulkens, P. M.; *Quinolones in 2005: an update*. Clinical Microbiology and Infection, 2005. **11**(4): p. 256-280.
9. Ball, P.; *Quinolone generations: natural history or natural selection?* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **46**: p. 17-24.
10. Cheng, D., Xu, W. R., and Liu, C. X.; *Relationship of quantitative structure and pharmacokinetics in fluoroquinolone antibacterials*. World Journal of Gastroenterology, 2007. **13**(17): p. 2496-2503.
11. Park, H. R., Kim, T. H., and Bark, K. M.; *Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **37**(6): p. 443-460.
12. Hooper, D. C.; *Clinical applications of quinolones*. Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression, 1998. **1400**(1-3): p. 45-61.
13. Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M., and Estelrich, J.; *Physicochemical properties of enrofloxacin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997. **15**(12): p. 1845-1849.
14. Barron, D., Jimenez-Lozano, E., Bailac, S., and Barbosa, J.; *Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002. **767**(2): p. 313-319.

15. Turiel, E., Martín-Esteban, A., Bordin, G., and R.Rodríguez, A.; *Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl solid-phase extraction cartridges*. Anal Bioanal Chem, 2004. **380**: p. 123-128.
16. Langlois, M. H., Montagut, M., Dubost, J. P., Grellet, J., and Saux, M. C.; *Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005. **37**(2): p. 389-393.
17. Luthoft, H. C. H., Vaes, W. H. J., Freidig, A. P., Halling-Sorensen, B., and Hermens, J. L. M.; *Influence of on and other modifying factors on the distribution behavior of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by "negligible-depletion" SPME-HPLC*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(23): p. 4989-4994.
18. Perez, M. A. C., Diaz, H. G., Teruel, C. F., Pla-Delfina, J. M., and Sanz, M. B.; *A novel approach to determining physicochemical and absorption properties of 6-fluoroquinolone derivatives: experimental assessment*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002. **53**(3): p. 317-325.
19. Varanda, F., de Melo, M. J. P., Caco, A. I., Dohrn, R., Makrydaki, F. A., Voutsas, E., Tassios, D., and Marrucho, I. M.; *Solubility of antibiotics in different solvents. 1. Hydrochloride forms of tetracycline, moxifloxacin, and ciprofloxacin*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006. **45**(18): p. 6368-6374.
20. Ross, D. L. and Riley, C. M.; *Physicochemical Properties of the Fluoroquinolone Antimicrobials .2. Acid Ionization-Constants and Their Relationship to Structure*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. **83**(1-3): p. 267-272.
21. Vazquez, J. L., Merino, S., Domenech, O., Berlanga, M., Vinas, M., Montero, M. T., and Hernandez-Borrell, J.; *Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin: influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **220**(1-2): p. 53-62.
22. Carey, Francis A., *Organic chemistry*. 3rd ed ed. 1996, New York: McGraw-Hill. XXXII, 1269 , pag. var.
23. Sun, J., Sakai, S., Tauchi, Y., Deguchi, Y., Cheng, G., Chen, J. M., and Morimoto, K.; *Protonation equilibrium and lipophilicity of olamufloxacin (HSR-903), a newly synthesized fluoroquinolone antibacterial*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003. **56**(2): p. 223-229.
24. Sun, J., Sakai, S., Tauchi, Y., Deguchi, Y., Chen, J. M., Zhang, R. H., and Morimoto, K.; *Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and grepafloxacin, in the protonation equilibrium*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002. **54**(1): p. 51-58.
25. Leo, A., Hansch, C., and Elkins, D.; *Partition Coefficients and Their Uses*. Chemical Reviews, 1971. **71**(6): p. 525-616.
26. Sangster, J., *Octanol-water partition coefficients fundamentals and physical chemistry*. Wiley series in solution chemistry. 1997, Chichester: John Wiley. VIII, 170.

27. Johnson, C. A. and Westall, J. C.; *Effect of Ph and Kcl Concentration on the Octanol Water Distribution of Methylanilines*. Environmental Science & Technology, 1990. **24**(12): p. 1869-1875.
28. Ross, D. L., Elkinton, S. K., and Riley, C. M.; *Physicochemical Properties of the Fluoroquinolone Antimicrobials .3. 1-Octanol Water Partition-Coefficients and Their Relationships to Structure*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. **88**(1-3): p. 379-389.
29. Takacs-Novak, K., Jozan, M., and Szasz, G.; *Lipophilicity of Amphoteric Molecules Expressed by the True Partition-Coefficient*. International Journal of Pharmaceutics, 1995. **113**(1): p. 47-55.
30. Sarveiya, V., Templeton, J. F., and Benson, H. A. E.; *Effect of lipophilic counter-ions on membrane diffusion of benzydamine*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **26**(1): p. 39-46.
31. Bouchard, G., Carrupt, P. A., Testa, B., Gobry, V., and Girault, H. H.; *The apparent lipophilicity of quaternary ammonium ions is influenced by Galvani potential difference, not ion-pairing: A cyclic voltammetry study*. Pharmaceutical Research, 2001. **18**(5): p. 702-708.
32. Hatanaka, T., Kamon, T., Morigaki, S., Katayama, K., and Koizumi, T.; *Ion pair skin transport of a zwitterionic drug, cephalexin*. Journal of Controlled Release, 2000. **66**(1): p. 63-71.
33. Quintana-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H., and Doelker, E.; *Applications of the ion-pair concept to hydrophilic substances with special emphasis on peptides*. Pharmaceutical Research, 1997. **14**(2): p. 119-127.
34. Koufopoulou, S. A., Pistos, C., Giaginis, C., and Tsantili-Kakoulidou, A.; *Application of the ion pair concept to the n-octanol-water partitioning of cefepime and ceftiofime*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **316**(1-2): p. 52-57.
35. Takacs-Novak, K. and Szasz, G.; *Ion-pair partition of quaternary ammonium drugs: The influence of counter ions of different lipophilicity, size, and flexibility*. Pharmaceutical Research, 1999. **16**(10): p. 1633-1638.
36. Neugebauer, U., Szeghalmi, A., Schmitt, M., Kiefer, W., Popp, J., and Holzgrabe, U.; *Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005. **61**(7): p. 1505-1517.
37. Takacs-Novak, K. and Tam, K. Y.; *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants - Part V: microconstants and tautomeric ratios of diprotic amphoteric drugs*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000. **21**(6): p. 1171-1182.
38. Park, H. R., Chung, K. Y., Lee, H. C., Lee, J. K., and Bark, K. M.; *Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2000. **21**(9): p. 849-854.
39. Ninomiya, R., Matsuoka, K., and Moroi, Y.; *Micelle formation of sodium chenodeoxycholate and solubilization into the micelles: comparison with other unconjugated bile salts*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2003. **1634**(3): p. 116-125.
40. Solomons, T. W. Graham and Fryhle, Craig B, *Organic chemistry*. 7th ed ed. 2000, New York: John Wiley. XXXI, 1258, 52.

